

ACTA

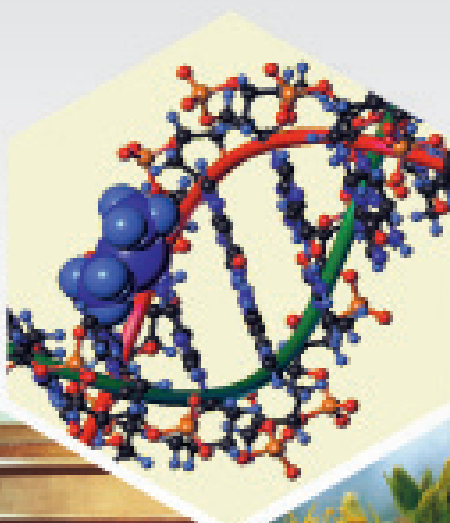
PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

1.

2012

APHGAO 82, (043) 1-52. (2012)



ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

<i>Pápay Zsófia Edit, Kósa Annamária, Boldizsár Imre, Ruszkai Ákos, Balogh Emese, Klebovich Imre, Antal István:</i> <i>Petroselinum crispum</i> kivonatának gyógyszerészeti vonatkozásai és formulálási lehetőségei . . .	3
<i>Csizmazia Eszter, Berkó Szilvia, Maroda Mónika, Szabóné Révész Piroska, Csányi Erzsébet:</i> A bőrön keresztüli hatóanyag permeáció modellezése és penetrációfokozók hatásának vizsgálata	15
<i>Sebe István, Szabó Barnabás, Zelkó Romána:</i> A pozitron annihilation élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása	23
<i>Kardos Zsuzsanna:</i> Krónikus obstruktív tüdőbetegség kezelése inhalációs farmakoterápiával: a kortikoszteroidok szerepe	33
<i>Inotai András, Kaló Zoltán:</i> Kockázat-megosztási technikák alkalmazása a közepes jövedelmű országokban	43

CONTENTS

<i>Pápay, Zs.E., Kósa, A., Boldizsár, I., Ruszkai, Á., Balogh, E., Antal, I.</i> : Pharmaceutical and formulation aspects of <i>Petroselinum crispum</i> extract	3
<i>Csizmazia, E., Berkó, Sz., Maroda, M., Szabó-Révész, P., Csányi, E.</i> : Modelling of percutaneous drug permeation and investigation of penetration enhancer effect.	15
<i>Sebe, I., Szabó, B., Zelkó, R.</i> : Positron Annihilation Lifetime Spectrometry (PALS) and its pharmaceutical applications.	23
<i>Kardos, Z.</i> : Treatment of chronic obstructive pulmonary disease with inhaled pharmacotherapy: role of corticosteroids	33
<i>Inotai, A., Kaló, Z.</i> : Risk sharing methods in middle income countries	43

Acta Pharmaceutica Hungarica: www.mgyt.hu

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu
Felelős kiadó: Prof. Dr. Vincze Zoltán
Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.
MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530
Adószám: 19000754–2–42
Előfizetési díj egész évre: 5133 Ft + 257 Ft áfa
Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 830 db
Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*
Sokszorosítás: Print Invest Magyarország-H Zrt., 1053 Budapest, Papnövelde út 8. II. em. 26.
Felelős vezető: Ványik László ügyvezető igazgató

Petroselinum crispum kivonatának gyógyszerészeti vonatkozásai és formulálási lehetőségei

PÁPAY ZSÓFIA EDIT¹, KÓSA ANNAMÁRIA², BOLDIZSÁR IMRE², RUSZKAI ÁKOS¹, BALOGH EMESE¹, KLEBOVICH IMRE¹, ANTAL ISTVÁN^{1*}

¹ Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet, 1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 7.

² Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényismereti Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C.

*Levelezési cím: antist@gytk.sote.hu

Summary

Pápay, Zs.E., Kósa, A., Boldizsár, I., Ruszkai, Á., Balogh, E., Antal, I.: *Pharmaceutical and formulation aspects of Petroselinum crispum extract*

Parsley (*Petroselinum crispum* L.) is a very popular spice and vegetable in Europe, it is widely spread and easy to grow. It's herb and fruits are known to be diuretic, smooth muscle relaxant and hepatoprotective. The most important identified active ingredients are flavonoids, coumarins and vitamin C. Apigenin and its glycosides are the main flavonoids in parsley, it can be found relatively large amounts in the leaves. The bioactive flavonoid apigenin has antiinflammatory, antioxidant and anticancer activities. The objectives of this study were the preparation and determination of the apigenin content of the parsley extract and the formulation using inert pellets by layering the apigenin in fluid-bed process

Keywords: *Petroselinum crispum*, apigenin, pellet

Összefoglalás

A petrezselyem (*Petroselinum crispum* L.) Európában őshonos kedvelt fűszer és zöldség növény, amely gyakori és könnyen is termesztethető. Levele és magja diuretikus, simaizom relaxáns és májvédő hatásairól ismert. Azonosított hatóanyagai közül kiemelkednek a flavonoidok, kumarinok és a C-vitamin. A flavonoidok közül legfontosabb az apigenin és glikozidjai, melyek viszonylag nagy mennyiségben találhatók a levélben. Az apigenin, mint bioaktív flavonoid gyulladáscsökkentő, antioxidáns és daganatellenes hatásokkal is rendelkezik. Munkánk során célul tűztük ki a petrezselyem hatóanyagainak áttekintését, apigenin-tartalmú kivonat előállítását és vizsgálatát. A formulálási munka során a *Petroselinum crispum* apigenin tartalmú kivonatát inert pelletmagra rétegeztük fluidizációs porlasztásos technológia alkalmazásával.

Kulcsszavak: *Petroselinum crispum*, apigenin, pellet

Bevezetés

Az apigenin jól ismert flavonoid, mely főleg glikozidok formájában fordul elő a természetben. Legnagyobb mennyiségben az Apiaceae család tagjaiban található (kamilla, zeller, petrezselyem), de ezen kívül a Brassicaceae család néhány tagjában, citrusfélékben és a búzacsírában is előfordul [1].

Legfontosabb apigenin beviteli forrásunk a petrezselyem és a zeller. Az átlagos apigenin bevitel körülbelül 1,3 mg/nap [2]. A petrezselyem levélben 60-300 mg/100 g, gyökérben 15,4 mg/100 g, míg a zellerlevélben 24,8 mg/100 g, zellergumóban 2,41 mg/100 g található [3, 4]. Kiemelkedő még az articsóka apigenin tartalma is (68 mg/100 g szárazanyagra vonatkoztatva).

Számos jól ismert gyógynövényünkben is megtalálható az apigenin [5]:

- *Matricariae flos* (*Chamomilla recutita* L. – Kamilla virág)
- *Taraxaci flos* (*Taraxacum officinale* L. – Gyermekláncfű)
- *Passiflorae herba* (*Passiflora incarnata* L. – Golgotavirág)

- *Melissae folium* (*Melissa officinalis* L. – Citromfű)
- *Plantaginis lanceolata folium/herba* (*Plantago lanceolata* L. – Lándzsás útifű)

A *Petroselinum folium* és *fructus* gyógyászati felhasználása az ókori időkig nyúlik vissza, illóolaját főként vizelethajtóként, étvágyjavítóként és görcs-

I. táblázat

Néhány növény apigenin tartalma [9]

Növény	Apigenin (mg/100 g)
Borsmenta	10-50
Cukorrépa	≤ 5
Kakukkfű	50 ≤
Káposzta	≤ 5
Karfiol	≤ 5
Kelbimbó	≤ 5
Metéltőhagyma	≤ 5
Paprika	≤ 5
Paradicsom	5-10
Saláta	≤ 5
Spenót	≤ 5

II. táblázat

Nyers petrezselyem tápanyagtartalma 100 g-ban [9]

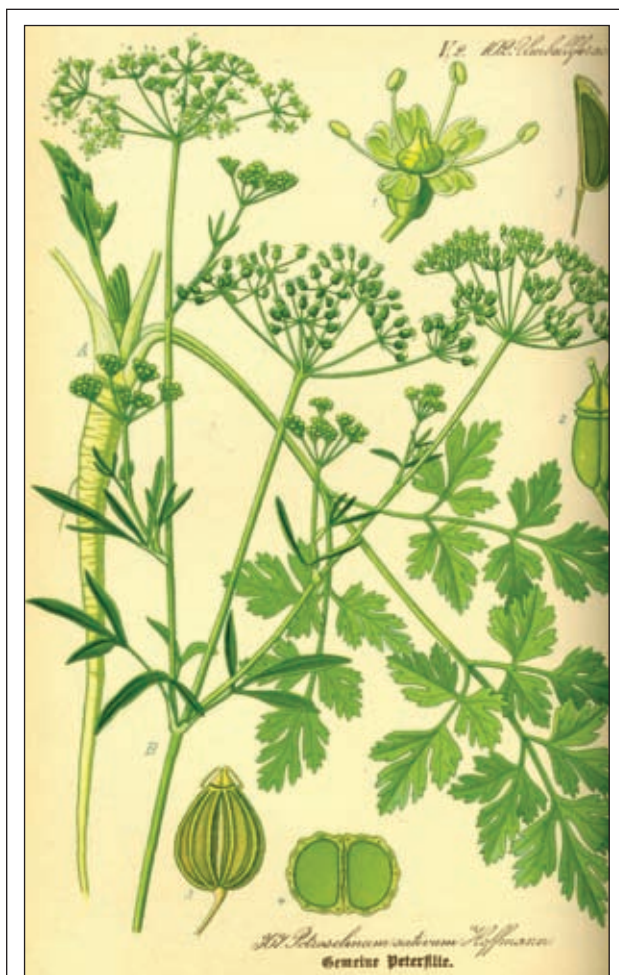
Tápanyagok	mennyisége
Szénhidrátok	6,3 g
• cukor	0,9 g
• rost	3,3 g
Zsír	0,8 g
Fehérje	3 g
Tiamin	0,1 mg
Riboflavin	0,2 mg
Niacin	1,3 mg
Cink	1,1 mg
Pantoténsav	0,4 mg
Piridoxin	0,1 mg
Folsav	152 µg
C-vitamin	133 mg
Kalcium	138 mg
Vas	6,2 mg
Magnézium	50 mg
Foszfor	58 mg
Kálium	554 mg

oldóként használták [1], háború idején petrezselyem teát adtak a vérhasban szenvedő katonáknak [6]. Napjainkban is vesekőhajtó, hólyaghurut és magas vérnyomás elleni teák alkotórésze, illóolaját az élelmiszer- és likőripar is alkalmazza. Az 1960-as években mutatták ki először, hogy a flavonoidok közül a rákellenes hatás tekintetében a legfontosabb az apigenin. Az 1990-es évek végén az apigenin jelentőségére további kísérletek mutattak rá, melyek szerint a DNS szintézis gátlásán keresztül képes emlő daganatsejtek növekedését gátolni [70].

2. Irodalmi áttekintés

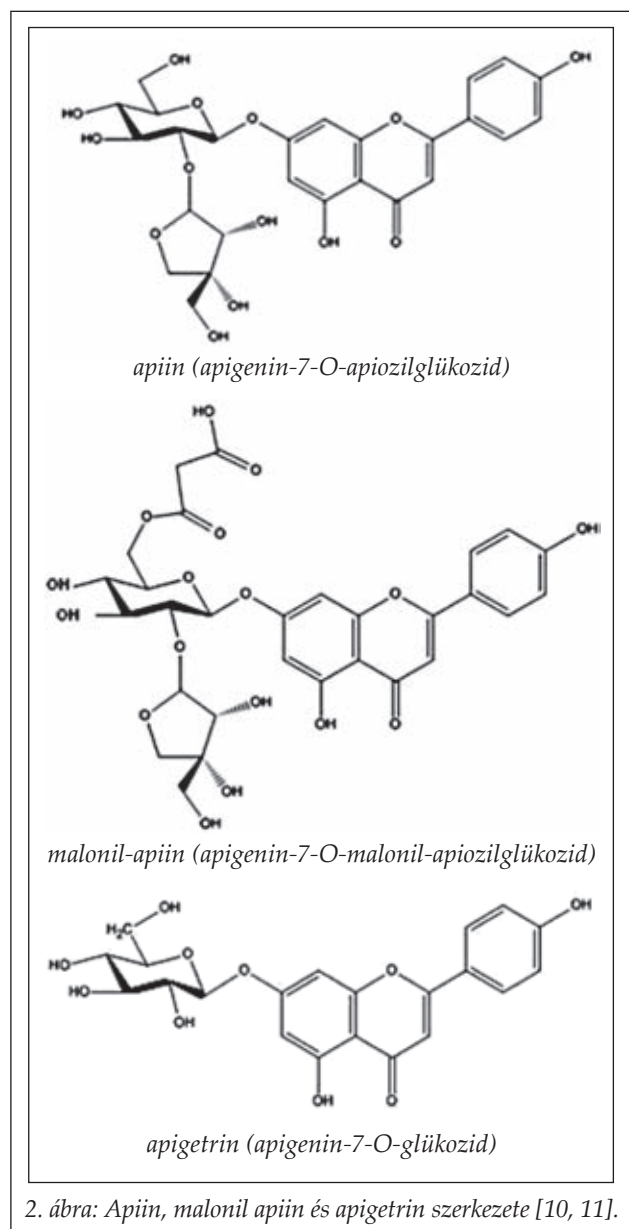
2.1. Petrezselyem morfológiája, hatóanyagai és hatásai

A petrezselyem az Apiaceae (Ernyősök) családjába tartozik, ezen belül a Petroselinum nemzetségbe. Több fajt különböztetik meg: a sima levelű metélőpetrezselymet (*P. neapolitanum*), a gyökérperezselymet (*P. tuberosum*) és a fodros metélőpetrezselymet (*P. crispum*). Kétnyári növény, az első évben fejleszti ki tőleveleit és húsos gyökerét, a másodikban a virágzatát. Karógyökere raktározó, színe sárgásfehér. Levelei sötétzöldek, szárnyasan összetettek, hasonlítanak a foltos bürök levélzetére. Hajtása a második évben eléri a 70-80 cm-t. Virágzata összetett ernyő, sárgászöld virágokkal. Termése illóolajokban gazdag. A világosbarna ter-

1. ábra: *Petroselinum crispum* [71]

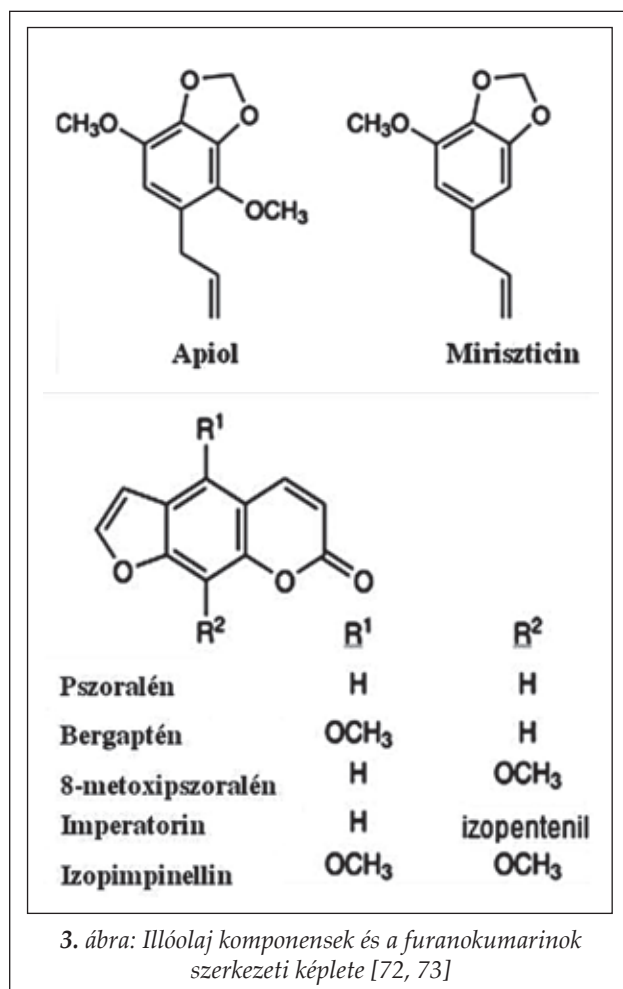
més a két szemben lévő oldalról lapított, tojásdad vagy körte alakú ikerkaszat. A termést két résztermés alkotja, amely egyenként 2-3 mm hosszú és 1,5 mm vastag, öt szalmasárga borda fut végig rajta (1. ábra). Ez a könnyen természetű növény ásványi anyagok és vitaminok mellett (II. táblázat) számos más hatóanyagot is tartalmaz.

Kiemelt terápiás hatással rendelkeznek flavonoidjai (apiin, apigenin, luteolin) és illóolaja [7, 8]. A flavonoidok általában cukrokkal konjugálódva raktározódnak növényekben; malonsavval történő konjugálódás után a növényi sejt vakuolumaiban tárolódnak. Az apigenin is leggyakrabban cukrokkal és savakkal (malonil, acetil) konjugálódik, ennek következtében több apigenoid fordul elő, kisebb mennyiségben a szabad aglikon is [10]. Így a petrezselyemben az apigenin malonil-apiin, apiin és apigetrin formájában található leginkább (2. ábra). Aprítás és a szárítás hatására a malonilapiin apiinné bomlik. Az apigenin biapigenin formájában a *Hypericum perforatum*-ban fordul elő, ahol neuroprotektív hatású [11]. A flavonoidok, mint



másodlagos anyagcsere termékek a növény káros hatásokkal (UV sugárzás, ózon és kémiai ágensek) szembeni védekező mechanizmusa révén keletkeznek [12].

Az apigenin flavonvázis vegyület, bioszintézise a fahéjsav átalakításával kezdődik cinnamát-4-hidroxiláz enzim segítségével *p*-kumarinsavvá. További lépésekben kalkon-szintáz hatására tetra-hidroxicalkon keletkezik, ami átalakul sztereospecifikus izomerizációval (2S)-flavanonná a kalkon izomeráz enzim segítségével. Ez fontos kiinduló vegyülete számos flavonoidnak, beleértve a flavonokat is. A legtöbb esetben a membránhoz kötött flavon-szintáz II enzim katalizálja a flavonok szintézisét (2S)-flavanonból, azonban az Apiaceae család néhány tagjában a citoszolban



levő flavon-szintáz I katalizálja ezt a reakciót. A petrezselyemben az apigenin a citoszolban levő flavon-szintáz I katalízisével keletkezik a flavanon vázas naringeninből [13].

Az illóolaj fenilpropán származékokat (apiol és miriszticin), valamint monoterpéneket tartalmaz (3. ábra). Az apiol és a miriszticin komponensek mennyisége és aránya a lelőhelytől és a fajtától is függ [14]. Az illóolaj erős vizelethajtó hatású, amely főként a fenilpropánok vese-parenchimára gyakorolt izgató hatásán alapszik. Nagyobb dózisban az apiol a belek, a húgyhólyag, s mindenekelőtt a méh simaizomzatának összehúzódnak képességét fokozza.

Csökkenti a menstruációs panaszokat, ellenben túl nagy dózisban az olaj és az izolált apiol abortív hatású és súlyos vesevérzést is okozhat [7]. Alacsonyabb illóolaj-tartalma alapján a hajtásdrog és a gyökérdrog enyhébb hatású, mint a termések [15].

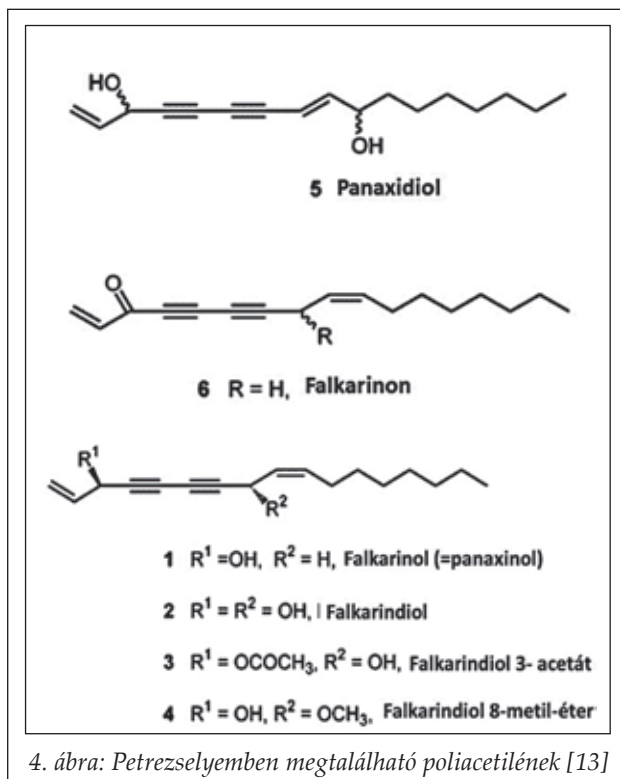
A növény egyes részeinek hatóanyagtartalmát a III. táblázat szemlélteti. A hatóanyag tartalom jelentősen függ a növény genotípusától és növekedésének körülményeitől [16]. Ezen kívül jelentős a

C-vitamin, tokoferol és karotinoid (lutein, 3- β -karotin) tartalma, melyek a polifenolokon kívül a növény antioxidáns hatását adják [8, 17-19].

Fontos megemlíteni a poliacetiléneket is, melyek az Apiaceae családban elterjedt vegyületek, így a petrezselyemben is megtalálhatóak. A legtöbb bioaktív poliacetilén e család tagjaiban fordul elő (zeller, répa, petrezselyem). Sokféle poliacetilén molekula létezik, a petrezselyem levélben a falkarinol típusúak találhatók meg elsősorban (4. ábra). Ezek C-17 alifás bioaktív molekulák a természetes peszticidek, toxikus hatásúak gombákra és baktériumokra. Allergiás reakciókat és kontakt dermatitist okozhatnak, mert bizonyos koncentrációban toxikusak az emlős sejtekre is, mely ugyanakkor a rák ellenes küzdelemben felhasználható lehet. A falkarinol és a belőle származtatott C-17 acetilének emberre nem toxikus koncentrációban már hatásosnak bizonyultak baktériumok ellen, valamint a falkarindiollal együtt gyulladáscsökkentő és vérlemezke aggregáció gátló hatásúak, feltehetően gátlják a lipooxygenázt és befolyásolják a prosztaglandin katabolizmust. A panaxidol, panaxitriol és a falkarinol citotoxikus hatásúnak bizonyult rákos sejtvonalakban, a leghatásosabbak a humán gyomor adenokarcinoma sejtvonalban voltak (MK-1). A petrezselyemből extrahált panaxidol öt humán rákos sejtvonalban és leukémia sejtvonalakban is citotoxikus hatású volt. Hatásmechanizmusuk egyelőre még nem ismert, feltételezhetően nagy reaktivitáson alapszik.

Kimutatták, hogy a magas természetes β -karotin tartalom a vérben csökkenti a rákos megbetegedések incidenciáját, míg a β -karotin tartalmú étrend kiegészítők szedése nem véd a rákos megbetegedések ellen. Ezért feltételezik, hogy más anyagoknak, mint a poliacetiléneknek is nagy szerepük lehet a megelőzésben. Ezen vegyületek kettős hatása megerősíti azt a hipotézist, mely szerint a toxikus anyagoknak kis koncentrációban kedvező hatásaik vannak [13].

A petrezselyem hatásai sokszínűek és mint általában a gyógynövényekben, a hatóanyagcsoportok szinergens hatása érvényesül. A legismertebb a diuretikus, ezáltal vérnyomáscsökkentő hatása,



4. ábra: Petrezselyemben megtalálható poliacetilének [13]

de ezen kívül jelentős antioxidáns, hepatoprotektív, vércukorszint-csökkentő, simaizom relaxáns és fitoösztrogén hatásokkal is rendelkezik.

Vérnyomáscsökkentő hatása ősidők óta ismert, ezt főleg a diuretikus és vérlemezke aggregáció gátlásán keresztül fejt ki. Kísérletekben igazolták, hogy a petrezselyem kivonat dóziszfüggően gátolta a Na⁺-K⁺-ATPáz (NKA) *in vitro* aktivitását. Az NKA enzim nemcsak a vesében, hanem a szívben és a belekben is megtalálható, működése során egy molekula ATP hidrolízisével két K⁺ iont transzportál az extracelluláris térből az intracelluláris térbe, miközben három Na⁺ iont juttat ki a sejtől. A belekben történő NKA enzim gátlása *laxatív hatást* is eredményez, mert csökkenti a mukóza nátrium abszorpcióját, így stimulálva a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ szimportert, melynek következtében megnő a kálium, a klór és a víz retenciója a bél lumenében [20]. A vese cortexben a NKA enzim gátlása 95%-osnak, a medullában ez 55%-osnak bizonyult. A diuretikus hatáshoz azonban nem csak a

III. táblázat

Petroselinum crispum drogjai és hatóanyagai [15]

Drog	Hatóanyagok
terméshedrog (<i>Petroselinum fructus</i>)	2–7% illóolaj, apiin, petrosilan-tartalmú zsírosolaj
levéledrog (<i>Petroselinum folium</i>)	≤0,3% illóolaj, flavonglikozidok, C-vitamin
gyökéredrog (<i>Petroselinum radix</i>)	0,5-1% illóolaj, flavonglikozidok, furanokumarinok (bergaptén, izoimperatorin) nyálka

NKA enzim gátlása, hanem Na^+ - K^+ pumpa gátlása is közrejátszik, csökkentve a Na^+ , K^+ abszorpciót és a K^+ szekréciót. Bár a hatásmechanizmus nem teljesen tisztázott, az bizonyos, hogy nem Na^+ transzportra, hanem inkább a K^+ transzportra hat [21].

A vérlemezkék élettani funkciójuk mellett köztudottan nagy szerepet játszanak a kardiovaszkuláris megbetegedések, mint az arterioszklerózis, magas vérnyomás, ischémiás elváltozások kialakulásában. Bebizonyították, hogy idővel hiperaktívra és érzékenyebbekké válnak az agonistáikra, ezért fontos ezen változások megelőzése. Kiemelkedő a petrezselyem *vérlemezke aggregáció gátló* hatása. Kivonata dózisfüggően *in vitro* gátolta a trombin, ADP és a kollagén indukálta aggregációt, maximálisan 65%-ban. Ezeket az eredményeket megerősítette *ex vivo* kísérlet is, de *in vitro* a gátlás nagyobb volt, feltehetően a koncentráció különbség miatt. Ebből következik, hogy a hatást jelentősen befolyásolja a hatóanyagok biohasznosulása. Ezen kívül a vérzési időt elnyújtotta, valószínűleg az aggregáció gátlása miatt, de ez a jelenség nem mindig állt fenn. Hatásmechanizmusa egyelőre nem ismert, ugyanis sok aktív hatóanyagot tartalmaz a kivonat és ezek szinergizmusban vagy egyedül is hathatnak; talán egy szignál mechanizmust, a kitapadást vagy a vaszkuláris endothelium szekrécióját befolyásolva. Számos irodalom támasztja alá, hogy a flavonoidok képesek befolyásolni a vérárvadást, de ezen kívül a petrezselyemben levő furanokumarinoknak és a tokoferolnak is lehet ilyen hatása [22].

Egy másik kísérletben az apigenin és az apigenin-7-O-glükozid az ADP indukálta vérlemezke aggregációt jelentősen gátolta. Feltételezik, hogy az apigenin és metabolitja, a luteolin is hatásos gátlószere a tromboxán A_2 -nek [23].

A vérnyomáscsökkentő hatása mellett kiemelkedik a petrezselyem kivonatának *antioxidáns* hatása is [8]. Antioxidáns hatásának mechanizmusa a kávésav és más fenolos komponensek szabadgyökfogó és kelátképző képességén alapszik. Minél nagyobb a kivonat kelát komplex képző értéke, annál jobban védi a lipideket az oxidációtól, de okozója is lehet oxidációnak a fémionok (pl. vas) redukálásával [24, 25]. A *membránprotektív* hatás bizonyított, csökkentve a lipidperoxidációt megóvjva a sejteket a káros szabadgyököktől [8, 18]. A petrezselyem kivonata jelentős koncentráció függő redukáló képességgel rendelkezik, a herba kivonat antioxidáns hatása duplája a gyökérhez képest, melynek az eltérő flavonoid tartalom az oka [26, 27]. Az illóolaj két fő komponense a miriszticin

(32,75%) és az apiol (17,54%) is jelentős antioxidáns hatással bírnak [28]. Az aszkorbinsav standard redukáló képességének 20-40%-a a petrezselyem levél redukáló képessége, de kivonata meghaladta az ekvivalens mennyiségű aszkorbinsav hidroxilgyökfogó képességét [25].

Friss petrezselyem levelet tartalmazó étrend növelte a vérplazma antioxidáns kapacitását és csökkentette az oxidatív stresszt. Kimutatták, hogy a petrezselyem kivonata csökkentette az agyszövetben a D-galaktóz indukálta oxidatív stresszt, megemelve a szabadgyökfogó enzimek szintjét és aktivitását. A D-galaktóz egy redukáló cukor, ami megtalálható a szervezetben. Szintjének emelkedése csökkenti a szabadgyökfogó enzimek működését, mitokondrium károsodást és lipidperoxidációt okoz, mert képes reakcióba lépni lipidekkel és fehérjékkel. Az így keletkezett termékekből szabadgyökök keletkeznek, amik az öregedésért és különböző betegségek kialakulásáért felelősek, mint a csökkent motoros aktivitás, csökkent immunválasz és cukorbetegség [26]. Egészséges önkéntesen végzett kutatás során kimutatták, hogy egy hét petrezselyemfogyasztás után két szabadgyökfogó enzimnek (SOD, GR) is megemelkedett a szintje [29]. A szabadgyökfogó hatásából következik, hogy védelmet nyújt a megemelkedett vércukorszinttel összefüggő sejtkárosodásokkal szemben. A diabeteszes májkárosodás feltehetően a szabadgyökök képződése miatt alakul ki, ami lipidperoxidációt eredményez. A megnövekedett szabadgyökök száma a megnövekedett vércukorszint miatt lehetséges, mert a glükóz autooxidációt generál. Az I és II típusú diabeteszben is megfigyelhető a lipidperoxidáció okozta szövethárosodás. Diabeteszes patkányokban máj, bőr, aorta és szemlencse károsodásokat figyeltek meg. Petrezselyem kivonat adagolása után a májperoxidok a normál szintre csökkentek [30], amit alátámaszt az a fénymikroszkópos vizsgálat, melyben petrezselyem kivonattal kezelt cukorbeteg patkányok máján a szinuszoidok kevésbé vannak kitágulva, nincs vérbőség és a kapilláris epithelium fala is kevésbé sérült. A beteg állatok testsúlya csökkent, míg az egészségeseké nem változott a kezelés időtartama alatt. A *magas vércukorszintet* 14 nap után *csökkentette* maximum 50%-ban, de nincs hatása a hasnyálmirigy β sejtjeire. Feltehetően csökkenti a glükoneogenezist és serkenti a glikolízist, amiben az apigeninnek is szerepe van, de hatásmechanizmusa még ismeretlen [31, 32]. Mesterséges bélben vizsgálták több fűszernövény hatását az α -glikozidázra. A petrezselyem gátolta az enzimet (IC_{50} =

0,64 mg/ml), de ez a gátlás gyengébb, mint az akarbóze ($IC_{50} = 0,0036$ mg/ml) [33, 34]. A bél *simamizma* hatva *relaxáló* tulajdonságú, magjának és levelének etanolos kivonata dózis függően gátolta a spontán összehúzódás tónusát és az acetilkolin indukálta összehúzódást patkány ileumon, de az adrenerg receptorokra nincs hatással [34, 35]. A fitoösztrogének, mint az izoflavonok, lignánok, kumarinok a zöldségekben, gyümölcsökben és gyógynövényekben széles körben elterjedt vegyületek, megakadályozzák a csontsűrűség csökkenést, a posztmenopauzás tüneteket, az arterioszklerózist, kardioprotektívek és antikarcinogének. Ovariectomizált egereken petrezselyem kivonat adagolása 7 nap után megnövelte a méh súlyát. Az apiin ösztrogénszerű hatása megnőtt a cukorrész eltávolításával, tehát az apigenin hatásosabb az ösztrogén receptoron, mégis gyengébb, mint az endogén ösztrogén [36, 37]. Ezért jelentősége lehet az apigeninnek *hormonfüggő daganatok gyógyításában*. Emellett gátolta az aromataz, 17β -hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitását és a HER2 receptort *in vitro* [38, 39]. Kiemelkedő mértékben csökkenti az emlő, a gyomor, valamint vastagbél karcinóma előfordulásának kockázatát [40, 41]. A daganatellenes hatásában szerepet játszik a *jelátviteli utak és a sejtciklus gátlása* is [39, 42]. Célpontjai a szervezetben főként protein kinázok (protein kináz C, MAPK), melyek gátlásával jelentősen visszaszorítja a sejtek rosszindulatú proliferációját és a fő tumor promotor, az ornitindekarboxiláz erős inhibitora [39]. Ezen kívül kiemelkedik, hogy *apoptózist indukál* malignus sejtekben kaszpázok aktiválásával és a VEGF expresszió visszaszorításával *gátolja az angiogenezist*. A hypoxia-indukált faktor 1 alfa protein termelésének *gátlásával* megakadályozza a daganatos sejtek újraképződését [43]. Ezen kívül még hatással van a hősokk proteinekre, telomerázokra, zsírsav-szintázokra és mátrix-metalloproteázokra is [39, 44]. Feltételezik, hogy védő szerepe lehet *kardiovaszkuláris és neurodegeneratív betegségekben szabadgyökfogó* tulajdonságánál fogva. Az apigenin biológiai hatásai emlős sejtekben *in vitro* és *in vivo* főleg a káros szabadgyökök semlegesítésén alapul. Csökkenti az oxidatív stresszt és megnövelte az eritrocytákban a szuperoxid diszmutáz és glutation-reduktáz szintjét [19, 29]. *Gyulladáscsökkentő* hatását a COX 2 és NOS 2 enzim gátlásával feje ki, de a TNF hatásait is gátolja. Az immunrendszerre is hatással van, csökkenti az Ig E szintjét, de az Ig G, Ig M, Ig A szintjét nem befolyásolja [38]. Az említett hatások csak nagy vonalakban

vázolják az apigenin sokrétű és részben még fel nem derített hatásait.

2.2. Apigenin fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságai

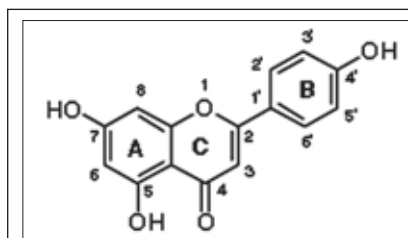
Az apigenin (4',5,7-trihidroxiflavon) (5. ábra) flavon vázas vegyület, mely három gyűrűből áll. Planáris molekula, a C3-C2-C1'-C2' torziós szöge 0° . Szomszédos gyűrűiben kiterjesztett delokalizált elektronrendszerrel rendelkeznek, mely jellemző a flavonoidokra. Ezekből következik, hogy ionizációs potenciálja alacsony, így könnyen vesz részt egy-elektron-transzfer mechanizmusokban.

Három hidroxil csoportot tartalmaz, melyekből H ion elvonásával gyökök keletkeznek. A legstabilabb gyök a C4'-OH csoportból keletkezik, míg a legkevésbé stabil gyök a C5-OH és a C4 ketocsoport közötti H- híd felbomlása után keletkezik. A legstabilabb gyök elektronsűrűségi adatai alapján a C4'-OH gyök nem kötő elektronpárja delokalizálódva van a B és a C gyűrű fölött, feltehetően a planáris konformáció miatt [45].

Az apigenin vízben kevésbé oldódik, azonban lúgokban és szerves oldószerekben jól oldódik, oldhatósága a hőmérséklet növelésével nő [46]. Könnyen képez komplexeket, leginkább kelátkomplex képződés figyelhető meg az Al(III) ion és C5-OH - C4=O csoportok között, az Al(III)-flavonoid komplex sztöchiometriája 1:3 [47]. Antioxidáns hatását voltametriás mérésekkel támasztották alá. Az oxidációs reakció teljesen irreverzibilis, az elektród felületén csak oxidálódik a molekula, míg redukció nem megy végbe. Az oxidálódás lehetséges mechanizmusa a 6. ábrán látható [48].

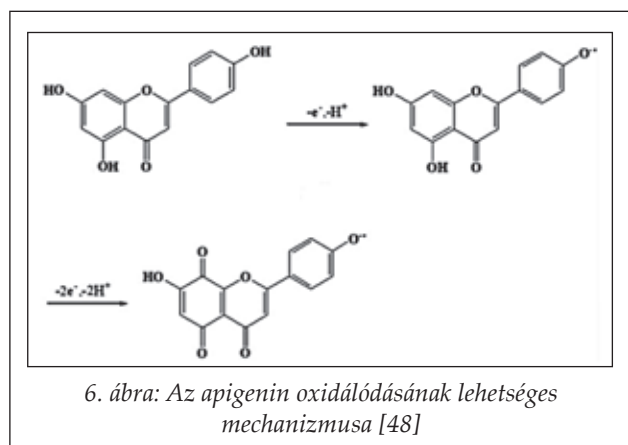
A flavonoidok stabilak fénnnyel szemben, de növekvő hőmérséklet hatására nő a degradáció. A pH is jelentősen befolyásolja a stabilitást, pH 5 és 7 között stabilabb, de pH 13-nál már 48%-os a bomlás. A kivonási technikának nagy jelentősége van a glikozidok mennyiségében. Hosszú távú stabilitási vizsgálatok azt mutatták, hogy vizes oldatban a glikozidok átalakulnak aglikonná [49].

A hidrolízis elősegíti a flavonoidok felszívódását,



5. ábra: Apigenin szerkezete [74]

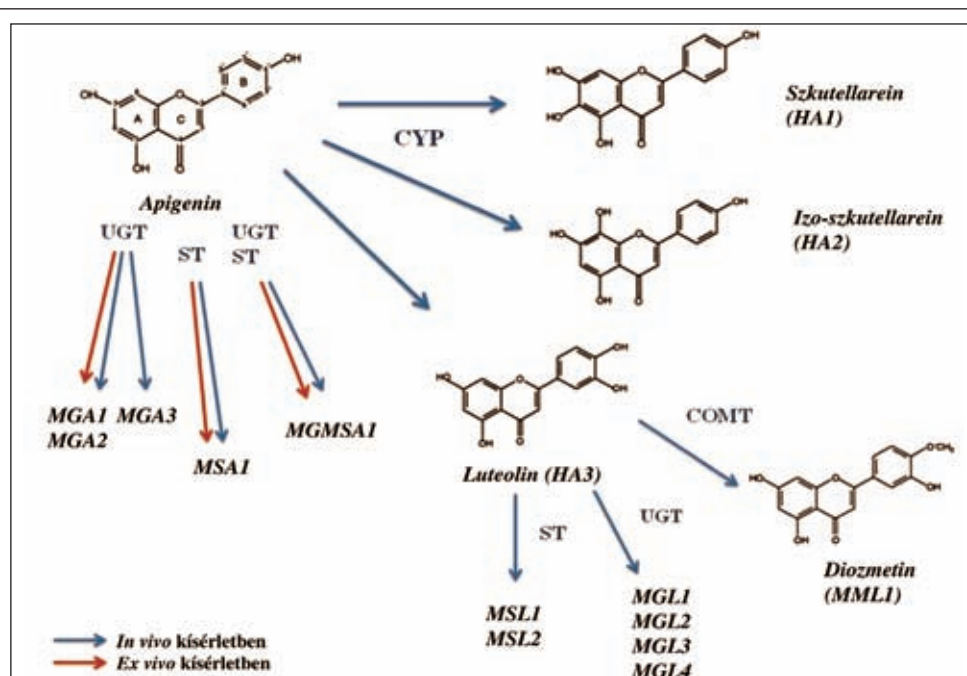
mert a cukor szubsztituens nagyon poláros, ami akadályozza a molekula celluláris felvételét [50]. Főzéssel vagy mikrohullámú



melegítéssel [29] szemben stabilak, tehát elfogyasztáskor a glikozidok nagyobb mennyiségben vannak jelen, mint az aglikonok. A glikozidos kötést a β -glikozidáz bontja, az apigenin-7-O- β -glikozidból a β -glikozidáz szabadítja fel az apigenint a szervezetben [51]. Azt feltételezték, hogy a glikozidok nem tudnak felszívódni a vékonybélben, míg el nem jutnak a vastagbél mikroflórájához és ott nem történik meg a hasítás a baktériumok β -glikozidáz enzimjei segítségével. Azonban ma már azonosítottak emberben is három natív β -glikozidáz enzimet. Ebből kettő – a glükocerebrozidáz és a laktáz-florizin-hidroláz – membránhoz kötött és specifikus szubsztátokkal rendelkeznek, míg a harmadik megtalálható a vékonybél, máj és vese sejtek citoszoljában.

Ennek az enzimnek a szubsztátjai a flavon-, flavanon- és izoflavon-7-glikozidok. Az apigenin-7-O-glikozid a vékonybélben 83%-ban, a májban 50%-ban deglikozilálódott, tehát a bélben aktívabb a cukrok hasítása [52]. Az apigenin, mint aglikon, könnyen bejut a sejtekbe feltehetőleg passzív diffúzióval, mert log P értéke 2,87 [53]. A sejtmembránban az apoláros gyűrűk feltehetőleg a lipid kettősréteg leghidrofóbb részén, míg a poláris csoportjai a vízes fázishoz közelebb helyezkednek el [54, 55].

A flavonoidok biohasznosulása és kiválasztása egyénekenként szignifikáns eltérést mutat, keveset tudunk a pontos felszívódásukról, metabolizmusukról. Feltehetően nagyban befolyásolja a hozzá kapcsolódó cukorrész típusa és kötési helye. Apigenin-glükozidokban gazdag ételek fogyasztása után detektálható az apigenin a plazmában, tehát felszívódik [56-58]. A plazmában humán szérum albuminhez (HSA) kötődik hidrofób és elektrosztatikus kötésekkel. A HSA II A szubdomain belső zsebének fala az úgynevezett *síte I* rész, aminek a bejáratánál helyezkedik el az apigenin molekula. Ez a rész belül hidrofób, a zseb bejárata pedig pozitívan töltött. Több kötődési lehetőség van az apigenin és a HSA között, de ezek instabilak, hamar eltűnnek, így dinamikus egyensúly alakul ki [59]. A bél különböző területeiről eltérő mennyiségben történik a felszívódás, legnagyobb százalékban a vastagbélben (40%), míg az ileumban a beadott mennyiségnek csak 21%-a abszorbeálódott. Alacsony maximum plazmakoncentrációt mértek, aminek a bél enterocytaiban és a májban történő nagy first pass metabolizmus is lehet az oka, de feltételezik, hogy metabolikus recirkuláló folyamatokban is részt vesz az apigenin molekula [58, 59]. A Fázis I metabolizmus során három monohidroxilált termék keletkezik, melyek közül a luteolin a major metabolit. Ezután a Fázis II alatt konjugálódási fo-



A = apigenin, L = luteolin, H = hidroxilált MG = monoglükuronizált, MS = monosulfatált, MGMS = monoglükuronizált-monosulfatált, MM = monometilált

lyamatokon megy keresztül, aminek következtében csak monoglükuronizált és monoszulfatált termékek keletkeznek (7. ábra).

Apigenin metilezett származékát nem mutatták ki, de keletkezik luteolin 4'- metilezett származéka a diozmetin, mely reakciót a COMT enzim katalizálja. Ezek kevésbé hatásosak, mint az aglikon. A CYP enzimek közül feltehetően főként az 1A2 és a 3A4 vesznek részt a metabolizmusban [60]. Nagyobb része széklettel, kisebb része a vizelettel ürül nagy individuális eltérésekkel [26].

2.3. Az apigenin gyógyszer technológiai vonatkozásai

Habár a petrezselyem kivonat jelentősége a gyógyászatban jól ismert, az apigenin és flavonoid tartalmú gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztésének kezdetén tartunk. Az apigenin és a flavonoidok alacsony biohasznosíthatóságának egyik oka vízben való rossz oldékonyságuk, annak ellenére, hogy poláros vegyületek. Bizonyított jótékony hatásaik miatt a közelmúltban több módszerrel is próbálták növelni a biohasznosíthatóságukat ciklodextrinekkel, valamint liposzómák, fitoszómák és nanokristályok előállításával mind orális, mind dermális készítményekben.

Néhány flavonoidot (luteolin, apigenin és kizin) különböző ciklodextrinekkel sikerült zárványkomplexebe vinni. Azt tapasztalták, hogy minél több hidroxil csoportot tartalmaz a flavonoid, annál stabilabban kötődik. A kötődések másodlagos kötőerőkkel történnek, mint H-kötés, hidrofób és van der Waals erők. UV-Vis abszorpciós spektroszkópiával mérve mindegyik CD szolubilizálta az apigenint, de leghatékonyabban a 2-hidroxi-propil- β -ciklodextrin (HP- β -CD). Növekvő koncentrációjával arányosan nőtt az apigenin koncentrációja az oldatban, az ideális sztöchiometria 1:1 mol volt [61]. A β -CD jelenleg a gyógyászatban legjobban elterjedt, a gyógyszerformulálásban leggyakrabban alkalmazott ciklodextrin. Orálisan nagy dózisban is biztonsággal és jól tolerálhatóan adagolható, de parenterálisan nem használható. Kis mértékben (1-2%) szívódik fel a gyomor-bél traktusból, mellékhatások többsége a vastagbélben bekövetkező bakteriális fermentációból adódik (gázképződés, hasmenés) [62].

Egy dermálisan alkalmazható gyulladáscsökkentő készítményben az apigenint *liposzóma* formájában alkalmazták. A liposzómák alkalmasak a rosszul oldódó anyagok szolubilizációjára és jól penetrálnak a bőrön keresztül. Szájon át nem alkalmazhatók a gyomor alacsony pH-ja és az epesavak

szolubilizáló hatása miatt, de dermális készítményekben a bőr mélyebb rétegeibe juttatják a hatóanyagot, és az adott területen hosszabb ideig fejtik ki a hatásukat. A kísérlet során apigeninben és 7-O-glükozidjában gazdag kamilla kivonatot formuláltak liposzómás és nem liposzómás o/v típusú krémbe. Közismert, hogy a kamilla, melynek egyik fő hatóanyaga az apigenin – bőrön gyulladáscsökkentő hatású; ekcéma, dermatitis és allergia helyi kezelésére, valamint sebgyógyulás elősegítésére alkalmazzák. Az *in vivo* kísérlet során bebizonyosodott, hogy a liposzómális apigenint tartalmazó krém gyulladáscsökkentő hatása erősebb volt, mint a szabad formában levőt tartalmazó, annak ellenére, hogy a hatóanyagot ugyanolyan mennyiségben tartalmazták. Ez az eredmény arra mutat rá, hogy az apigenin a jövőben helyettesítheti a sok mellékhatással rendelkező kortikoszteroid terápiát [63].

Egy amerikai szabadalomban a liposzómális flavonoidokat szilárd formában állították elő, hogy könnyebb legyen a további feldolgozás krémekbe, gélekbe, vizes mikrodiszperziókba vagy akár tablettákba is. Helyileg alkalmazva 0,1-10%-ban tartalmazták a hatóanyagot, orálisan vagy parenterálisan alkalmazva 1-500 mg-ban [64].

Egy másik nano méretű, liposzómákhoz hasonló felépítésű, növényi hatóanyagokat tartalmazó hordozó rendszer a *fitoszóma*. A „fito” arra utal, hogy növényi, a „szóma” pedig testet jelent. A fitoszómák a rosszul felszívódó növényi hatóanyagok felszívódását segítik. Ezáltal biohasznosulásuk sokkal jobb, mint az egyszerű növényi kivonatoké, mert a fitoszómák könnyen átjutnak a lipidben gazdag sejtmembránokon. Belsőleges vagy külsőleges készítményekben is alkalmazhatók, mert orálisan és bőrön keresztül is jól felszívódnak. Ezt a technológiát a kozmetika iparban használták először, de ma már a gyógyszeripar is alkalmazza. A fitoszómák lipid komponense általában foszfatidilkolin, amit szójából nyernek. A fitoszómákban a feji részhez kötötten található a hatóanyag, mintegy fitofoszfolipid komplexet képezve, így önálló molekulát alkotva. Másodrendű hidrogén kötések jönnek létre a foszfátcsoportok és a flavonoidok fenolos hidroxil csoportjai között, míg a liposzómákban nem alakulnak ki ilyen kötések. A kötések létrejötte jobb felszívódást és jobb stabilitást biztosít. A fitoszómák nagy előnye a liposzómákkal szemben, hogy orálisan is adagolható, hiszen a kialakult komplexet a gyomorsav nem bontja, ráadásul a foszfolipid molekulák megnövelik a membránok átjárhatóságát (8. ábra).

IV. táblázat

Néhány forgalomban levő fitoszómát tartalmazó készítmény [65]

GINKGOSELECT®	Ginkgo biloba L.	Antioxidáns, agyi mikrocirkuláció serkentő
SILIPIDE®	Silybum marianum L.	Májvédő
PROANTHOCYANIDIN A2	Aesculus hippocastanum L.	UV védelem, sebkezelés
GINSELECT®	Panax ginseng	Bőr rugalmasság növelő

A fitoszómák bizonyítottan jobb farmakokinetikai és farmakodinámiás paraméterekkel rendelkeznek, így jobb terápiás hatás érhető el. Már formuláltak apigenin-7-glükozidot fitoszómába, ami kutatások szerint egy újabb eszköz lehet a bőrrák kezelésében [65].

Jelentős előnyökkel bíró fellendülésben levő technológia nano méretű kristályok, azaz *nanokristályok* előállítása. Egy nanokristály mérete kisebb, mint 100 nm, így ideális hordozói néhány orálisan adagolt, alapvetően rossz biohasznosulással rendelkező hatóanyagnak, mint a sirolimus (Rapamune®) vagy az aprepitant (Emend®). A BCS (Biopharmaceutical Classification System) II. és IV. csoportjába tartozó hatóanyagoknál a rossz oldhatóság illetve permeabilitás alacsony biohasznosulást eredményez. A nanokristályok alkalmazható nanoszuszpenzió (nanoszol) formájában parenterálisan adagolva, vagy per os tablettába illetve pelletékbe inkorporálva, amikor nyújtott hatás elérése a cél, valamint dermális készítményekben. Kozmetikai készítményekben rosszul oldódó antioxidánsokat (rutin, heszperidin) nanoszuszpenzió formájában alkalmaznak. Például a *Juvedical* (2007) bőroregedést gátló arckrém rutint tartalmaz, a *Platinum Rare* (2009) heszperidint. A nanokristályokat az o/v típusú kenőcsök vizes fázisához adják, így megnő a rosszul oldódó hatóanyag oldhatósága a vizes fázisban, mely megnövekedett koncentráció gradienst vezet a készítmény és a bőr stratum corneuma között. A felszívódott hatóanyag a vizes fázisból gyorsan kiegyenlítődik új molekulákkal a nanokristályokból. A nanoszuszpenziók mukózális felületeken is alkalmazhatók, nanoszuszpenziós spray vagy krém formájában. A nanoszuszpenziók jó adhezivitását növelni lehet pozitívan töltött polimerekkel, mivel az ellentétes töltés növeli az affinitást a kicsit negatív töltésű sejtekhez [66]. Apigenin nanokristályokat is állítottak elő a „smartCrystals CT” technológiával, ami egy második generációs, kombinált technológia a nanoszuszpenziók előállítására. Ezzel a módszerrel stabil nanokristályok állíthatók elő az apigeninből. Ezután a készítmény antioxidáns hatását vizsgálták. Az *in vitro* eredmények azt mutatták, hogy az

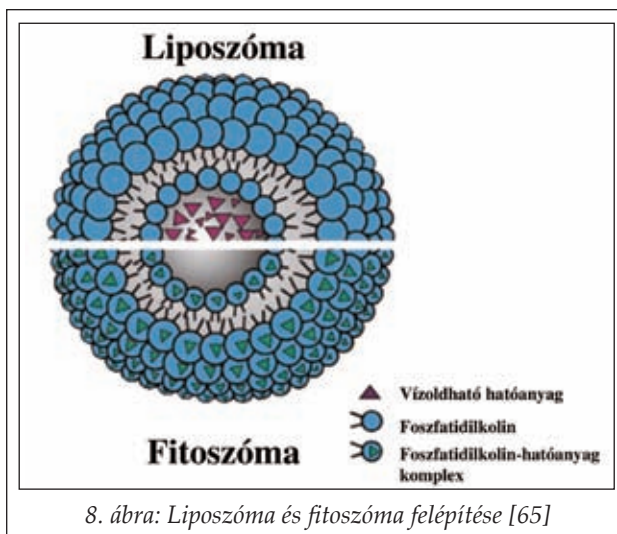
antioxidáns hatás majdnem megkétszereződött, és jól korreláltak a rutin nanoszuszpenzió *in vivo* eredményeivel. Ebből az látszik, hogy van lehetőség apigenint tartalmazó nanoszuszpenzió sikeres alkalmazására a rák megelőzése illetve a bőroregedés gátlása céljából dermális készítményekben [67].

3. Kísérletes rész

3.1. Anyagok és módszerek

A petrezselyem kivonat elkészítéséhez kereskedelmi forgalomból származó petrezselyem levelet használtunk fel. A friss petrezselyem víztartalma körülbelül 87% [68], 100 g friss növény 60-300 mg apigenint tartalmaz szabad aglikon és legfőképp glikozidok formájában [3, 4]. A hatóanyag tartalmát jelentősen befolyásolja a növény genotípusa, növekedésének körülményei, ezért több növény apiin és apigenin tartalmát mértük HPLC-vel, melyhez apigenin standardot szereztünk be (Sigma Aldrich). A glikozidok hidrolizálása 100 °C-on, 2M-os trifluorecetsavval történ egy órán keresztül.

A HPLC készüléket (Pharmacia LKB-HPLC 2248, Németország) UV detektorral alkalmaztuk. A vizsgálat körülményei a következők voltak: injektálási térfogat 20 µl, az oszlop GraceSmart RP18, 5 µm, 150 × 4,6 mm. Az A eluens acetonnitril:víz 15:85 v/v%, B eluens acetonnitril:víz 85:15

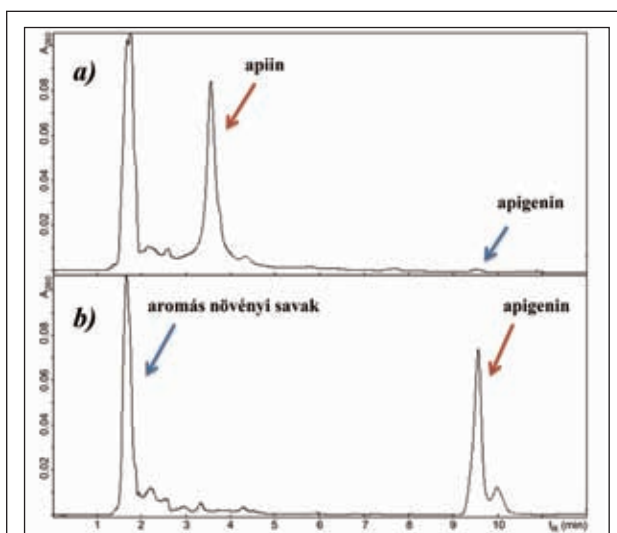


8. ábra: Liposzóma és fitoszóma felépítése [65]

v/v% arányú elegye volt gradiens elúciót alkalmazva, 0. percben 15%, 5. percben 30%, 12. percben 44% és a 20. percben 50% a B eluens. A teljes elúciós idő 20 perc, áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A hatóanyag mennyiséget a kivonó oldószer típusa, polaritása és a kivonás módszere is befolyásolja, irodalmi adatokra támaszkodva 70%-os etanollal történt a kivonás [69]. A HPLC-vel történő mérésekhez 0,05 g szárított petrezselyem levél port mértünk be. A levelek szárítása szárító készülékkel (Block Term Heating Module Type:656, Magyarország) történt 40 °C-on 24 óráig, a finomporítás kávéőrölővel történt. A bemért 0,05 g petrezselyem porhoz 2 ml 70%-os etanolt hozzáadva 60 °C-on, egy órán keresztül történt a temperálás, majd a centrifugálás (max. 5 perc, 3800 rpm, MLW T45, Németország). Ezután a felülúszót osztott kémcsőbe pipetázva, a csapadékra újabb 2 ml 70%-os etanolt töltve megismétlődött az inkubáció. Centrifugálás után a felülúszót leszedve a mintát 5 ml-re egészítettük ki. A pelleték bevonásához ez nem volt elegendő mennyiség, illetve méretnövelve ezt a folyamatot változtatás nélkül, nagy mennyiségű oldószerre lett volna szükség. Ezért koncentráltabb kivonatot készítettünk (15 ml/0,2 g por). A kivonás körülményein nem változtatva, de folyamatosan kevertetve összesen 725 ml kivonatot rétegeztünk 200 g inert izomalt pelletmagra (GalenIQ™ 980, BENEOPalatinus GmbH, Németország) alsó porlasztásos módszerrel Aeromatic-Fielder AG (Svájc) laboratóriumi fluidizációs készülékben. A kivonat adagolását perisztaltikus pumpa biztosította. Öt perces előmelegítést és öt perces utószárítást iktattunk be. A fluidizációs eljárás paraméterei:

Töltöttömeg	200 g
Fúvóka átmérő	0,8 mm
Adagolási sebesség	1,8-2 g/perc
Porlasztó levegő nyomása	1 bar
Fluid levegő áramlási sebessége	4-es fokozat
Belépő levegő hőmérséklet	45 °C
Kilépő levegő hőmérséklet	41 °C
Szárítás hőmérséklete	45 °C
Szárítás ideje	5 perc

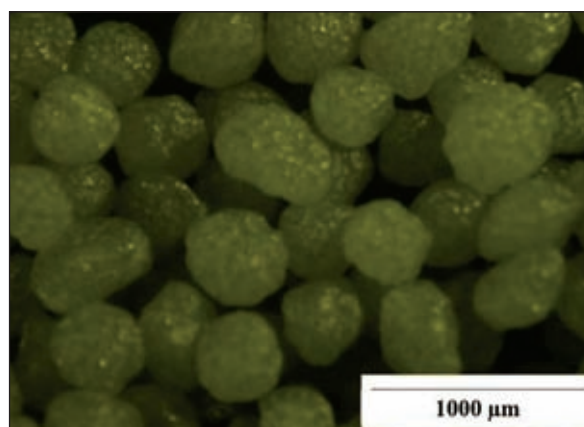
A rétegzett pelleték morfológiai jellemzőit sztereomikroszkópos képanalízissel (Nikon SMZ 1000, Japán) hasonlítottuk össze petrezselyem kivonat mennyiségének függvényében. A vizsgált minta 100 darab pelletet tartalmazott, melyek random módon kerültek kiválasztásra, egyszerre 10 pelletről készült fényképfelvétel. A képeket *Image*



9. ábra: Apiin és apigenin kromatogramja
a) hidrolizálatlan kivonat b) elhidrolizált kivonat



10. ábra: Zöld levelek apigenin tartalma 100 g száraz levélre vonatkoztatva ($M_{\text{apigenin}} = 270 \text{ g/mol}$)



11. ábra: Petrezselyem kivonattal rétegzett pelleték

J nyílt forráskódú képanalizáló szoftver (NIH, USA) segítségével elemeztük.

3.2. Eredmények

Különböző minták apiin és a belőle keletkező apigenin tartalmát mérve azt az eredményt kap-

V. táblázat

Hatóanyaggal rétegzett pelletek szemcsemérete (n=100)

Apigenin mennyisége (mg/100 g pellet)	Átlagos minimális Feret átmérő (μm) \pm SD
3,75	657,2 \pm 87,92
24,75	709,9 \pm 75,75
66,50	739,1 \pm 64,16

tuk, hogy átlagosan 1,4 g apigenin található 100 g száraz petrezselyemben. Az apiin retenciós ideje 3, 40 percnél volt. (9. ábra). A 2 perc körüli retenciós idővel jövő csúcsok a klorofill és aromás növényi savak jelei, 9 percnél az apigenin aglikon látható, de ezt nem tapasztaltuk a hidrolizálatlan minták esetében. Az eredmények szerint az apigenin nem csak apiin hanem más apigenoid formájában is megtalálható, amely azonban viszonylag igen kis mennyiség (10. ábra).

A kivonat pelletmagra történő rétegzése során azt tapasztaltuk, hogy az eljárás jól optimalizálható, és a pelletekre felvitt kivonat mennyisége jelentősen növelhető (11. ábra).

A fluidizációs rétegzést követően a pelleték mérete jellemzően változott a felvitt kivonat illetve az apigenin-tartalom mennyiségének növekedésével, amelyet az V. táblázat adatai szemléltetnek.

Következtetések

Bár a petrezselyem kivonat terápiás jelentősége jól ismert, az apigenin tartalmú gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztése sok megoldatlan kérdést vet fel. A formulálásnál kihívást jelent egyrészt az apigenin és a flavonoidok alacsony biohasznosíthatósága, másrészt a kivonat könnyen adagolható hordozórendszerben történő alkalmazása. Vizsgálataink szerint az inert pelletmagok alkalmas hordozók lehetnek az apigenin számára, a hatóanyag pelletmagokra történő rétegzése fluidizációs módszerrel megvalósítható.

IRODALOM

1. Rácz G., Rácz K. E., Laza A.: Gyógynövényismeret. Ceres Kiadó, Bukarest, 1984:207
2. L. Hanske, G.Loh, S.Sczesny, M. Blaut, A.Braune.: J. Nutr. 139,1095–1102 (2009)
3. H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa: J. Agric. Food Chem. 51, 571-581(2003)
4. Lugasi A. Hóvári J.: Acta Alimentaria. 29, 345-352 (2000)
5. ESCOP Monograph: The scientific foundation for herbal medicinal products 313.o., 492.o., 499.o., 359.o., 324.o., (2003)
6. T. Al-Howiriny, M. Al-Sohaibani, K. El-Tahir, S. Rafatullah: American Journal of Chinese Medicine. 31, 699-711 (2003)

7. Dános B.: Farmakobotanika Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006:125
8. Sz. Fejes, A. Blázovics, Lemberkovics É., Petri G., Kéry Á., Szőke É.: Phytotherapy Research 14, 362-365 (2000)
9. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Other/AICR03_VegFlav.pdf (2011, május)
10. G. Hostetler, K. Riedl, S. Schwartz: Effects of Juice Processing on Anti-inflammatory Flavonoids in Plant Foods. Food Science and Technology. Graduate student poster competition (2009)
11. Silva B., Oliveira P.J., Dias A., Malva J.O.: Neurotox Res. 13, 265-79 (2008)
12. U. Matern, W. Heller, K. Himmelsbach: Eur. J. Biochem. 133, 439-448 (1983)
13. L. P. Christensen, K. Brandt: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 683–693 (2006)
14. Petri G., Nyiredy Sz., Nyiredyné Mikita K.: Gyógynövények korszerű terápiás alkalmazása. Medicina, Budapest, 1989:84
15. Rápóti J. Romváry V.: Gyógyító növények. Medicina, Budapest, 1980:238-239.
16. A. Č. Mišan, N.M. Mimica-Dukić, A. I. Mandić, M. B. Sakač, I. Lj. Milovanović, I. J. Sedej: Cent. Eur. J. Chem. 9, 133-142 (2011)
17. Francis G.W., Isaksen M.: Chromatographia 27, 549–551 (1989)
18. Ke Cui, Xiaoling Luo, Keyi Xu, M.R. Ven Murthy: Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 28 771–799 (2004)
19. Shreya R Vora, Rahul B Patil, Meena M Pillai: Indian Journal of Experimental Biology 4, 338-342 (2009)
20. S. I. Kreydiyyeh, J. Usta, I. Kaouk, R. Al-Sadi: Phyto-medicine 8, 382–388 (2001)
21. S. I. Kreydiyyeh, J. Usta: Journal of Ethnopharmacology 79, 353–357 (2002)
22. D. Gadi, M. Bnouham, M. Aziz, A. Ziyat: Journal of Ethnopharmacology 125, 170–174 (2009)
23. D. S. A. Chaves et al.: Natural Product Communications 6, 961 – 964 (2011)
24. D. Jimenez-Alvarez, F. Giuffrida, P.A. Golay: J. Agric. Food Chem. 56, 7151–7159, (2008)
25. Peter Y.Y. Wong, David D. Kitts: Food Chemistry 97, 505–515 (2006)
26. Fejes Sz., Kéry Á., Blázovich A., Lugasi A., Lemberkovics É., Petri G. Szőke É.: Acta Pharmaceutica Hungarica 68, 150-156 (1998)
27. M. C̃ iz H. C̃ iz ova, P. Denev, M. Kratchanova, A. Slavov, A. Lojek: Food Control 21, 518–523 (2010)
28. Zhang, H., Chen, F., Wang, Xi., Yao, H.Y: Food Research International 39, 833–839 (2006)
29. S. E. Nielsen, J. F. Young, B. Daneshvar, S. T. Lauridsen, P. Knuthsen, B. Sandström, L. O. Dragsted: British Journal of Nutrition 81, 447–455 (1999)
30. O. Ozsoy-Sacan, R. Yanardag: Journal of Ethnopharmacology 104, 175–181 (2006)
31. S. Bolkent, R. Yanardag, O. Ozsoy-Sacan, O. Karabulut-Bulan: Phytother. Res. 18, 996–999 (2004)
32. R. Yanardag, S. Bolkent, O. Ozsoy-Sacan, Ö. Özsoy-Sacan: Biol. Pharm. Bull. 26, 1206–1210 (2003)
33. Y. Kawada, M. Miura, T. Gomyo: Food Sci. Technol. Res., 12, 275-277 (2006)
34. S. Brankovic, D. Kitic, M. Radenkovic, V. Ivetic, S. Veljkovic, M. Nasic: Med Pregl LXIII (7-8), 475-478 (2010)
35. N Mirzaie Damabi, A.A. Moazedi, S. M. Seyyednejad: Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 3, 866-870 (2010)
36. M. Yoshikawa, T. Uemura, H. Shimoda, A. Kishi, Y. Kawahara, H. Matsuda: Chem. Pharm. Bull. 48, 1039–1044 (2000)

37. S.J. Lee, H.Y. Chung, C. G.A. Maier, A. R. Wood, R. A. Dixon, T. J. Mabry: *J. Agric. Food Chem.* 46, 3325-3329 (1998)
38. S. Shukla, S. Gupta: *Pharm Res.* 27, 962-978 (2010)
39. T.D. Way et al: *FEBS Lett* 579, 145-152 (2005)
40. C. Bosettiet al.: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 16, 98-101 (2007)
41. B.N. Fink et al.: *American Journal of Epidemiology*, 165, 514-523 (2007)
42. M.B. Ujiki et al.: *Molecular Cancer* 5, 76 (2006)
43. M. Osada et al.: *FEBS Lett.* 575, 59-63 (2004)
44. F. Lindenmeyer et al.: *Nutr. Cancer* 39, 139-147 (2001)
45. M. Leopoldini: *J. Phys. Chem. A* 108, 92-96 (2004)
46. M. Xiao, W. Yan, Z. Zhang: *J. Chem. Eng. Data* 55, 3346-3348 (2010)
47. M. Bener, M. Ozyurek, K. Guclu, R. Apak: *Industrial Crops and Products* 32, 499-506 (2010)
48. T.L. Xing, F. Wang, Y.Y. Mao, L.P. Wang, B.X. Ye: *Journal of the Chinese Chemical Society* 56, 303-309 (2009)
49. J. K. Srivastava¹, S. Gupta: *Mol Cell Pharmacol* 1, 138-147 (2009)
50. U.K. Walle, T. Walle: *Drug metabolism And Disposition* 30, 564-569 (2002)
51. B. Pekic et al.: *Biotechnology Letters* 16, 229-234 (1994)
52. A. J. Day, M.S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M.J.C Rhodes, M. R.A Morgan, G. Williamson: *FEBS Letters* 436, 71-75 (1998)
53. B. Li, D.H. Robinson, D.F. Birt: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 721-725 (1997)
54. K. Murota et al.: *Journal of Nutrition* 132, 1956-1961 (2002)
55. F. Ollila: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 399, 103-108 (2002)
56. H. Meyer: *Ann. Nutr. Metab.* 50, 167-172 (2006)
57. J. Chen, H. Lin, M. Hu: *JPET* 304, 1228-1235 (2003)
58. J. Cao, Y. Zhang, W. Chen, X. Zhao: *British Journal of Nutrition* 103, 249-255 (2010)
59. J. L. Yuan: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 191, 104-113 (2007)
60. A. Gradolatto: *Drug Metabolism and Disposition* 33, 49-54 (2005)
61. H. Kim, H. W. Kim, S. Jung: *Bull. Korean Chem. Soc.* 29, 590-594 (2008)
62. Csernák Orsolya: A protonálódás hatása ciklodextrin zárványkomplexek stabilitására. *Doktori értekezés*, Budapest (2008)
63. I. Arsic: *Phytother. Res.* 25, 228-233 (2011)
64. E. Bombardelli et al.: *US Patient* (1991)
65. Thurapati Pandu Raju et al: *IRJP* 2, 28-33 (2011)
66. R. Shegokar, R. H. Müller: *International Journal of Pharmaceutics* 399, 129-13 (2010)
67. L. Al Shaal, R. Shegokar, R. H. Müller: *International Journal of Pharmaceutics* 420, 133-141 (2011)
68. <http://nutritiondata.self.com/facts/vegetables-and-vegetable-products/2513/2> (2011, február)
69. D.L. Luthria, S. Mukhopadhyay, A.L. Kwansa: *J Sci Food Agric* 86, 1350-1358 (2006)
70. Xu, G., et al.: Wei Sheng Yan Jiu *Journal of Hygiene Research*, 28, 151-152 (1999)
71. O.W. Thomé: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, 1885, Gera, Germany
72. H. Zhang, F. Chen, X. Wang, H.Y. Yao: *Food Research International* 39, 833-839 (2006)
73. <https://www.medicinescomplete.com/mc/herbals/current/login.htm?uri=http%3A%2F%2Fwww.medicinescomplete.com%2Fmc%2Fherbals%2Fcurrent%2FHBL1000735997.htm> (2011, március)
74. M. Skerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hras M. Simonic, Z. Knez: *Food Chemistry* 89, 191-198 (2005)

Érkezett: 2012. március 20.

A bőrön keresztüli hatóanyag permeáció modellezése és penetrációfokozók hatásának vizsgálata

CSIZMAZIA ESZTER, BERKÓ SZILVIA, MARODA MÓNICA,
SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA, CSÁNYI ERZSÉBET*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

*Levelezési cím: csanyi@pharm.u-szeged.hu

Summary

Csizmazia, E., Berkó, Sz., Maroda, M., Szabó-Révész, P., Csányi, E.: *Modelling of percutaneous drug permeation and investigation of penetration enhancer effect*

Present study provides a short review concerning the applicable membranes for modelling the percutaneous drug permeation and about their importance. The theoretical introduction summarizes the transdermal drug permeation routes and enhancement strategies. Two penetration enhancers are presented, the Transcutol and a sucrose ester, the Sucrose laurate which can offer an interesting possibility. Various recently applied and tested membranes (synthetic membrane, human, animal and artificial skin) are shown, which can be used for modelling dermal drug permeation. Furthermore two investigation methods are demonstrated for examining the drug diffusion, penetration and permeation, the vertical Franz diffusion cell and the ATR-FTIR spectroscopy, which can offer possibility for studying the skin at molecular level, too. Our previous *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experimental results support, that choosing the appropriate model membrane is of primary importance. Examining the drug permeation through the skin is indispensable to get information about the interactions between the drug, the penetration enhancers and the skin as well, and to study also the drug accumulation in the skin.

Keywords: Franz cell, FTIR, Human epidermis, Penetration enhance

Összefoglaló

Jelen tanulmány a bőrön keresztüli hatóanyag permeáció modellezésére alkalmazható membránokról kíván rövid áttekintést nyújtani és jelentőségükre rávilágítani. Az elméleti bevezető a perkután hatóanyag permeáció útjait és a penetrációfokozás lehetőségeit foglalja össze. Két ígéretes penetrációfokozó anyagot mutat be, a Transcutolt és a cukorészterek csoportjába tartozó Szacharóz-laurátot. Valamint bemutatásra kerülnek a napjainkban alkalmazott és kipróbálás alatt álló különböző membránok (szintetikus membrán, humán, állati és mesterséges bőr), melyek hatóanyagok dermális permeációjának modellezésére használhatók. Továbbá ismertetni kívántuk a hatóanyag diffúzió, penetráció és permeáció vizsgálatára szolgáló módszerek közül a vertikális Franz diffúziós cellát és az ATR-FTIR spektroszkópiát, mely lehetőséget nyújt a bőr molekuláris szinten történő tanulmányozására is. Korábbi *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* kísérletes eredményeinkkel pedig azt kívántuk alátámasztani, hogy a permeációs vizsgálatok során alapvető fontosságú a célnak leginkább megfelelő modell membrán kiválasztása. A bőrön keresztüli hatóanyag permeációs vizsgálatok elvégzése ugyanis elengedhetetlen ahhoz, hogy információt kapjunk arról is, hogy a hatóanyag és penetrációfokozók kölcsönhatásba lépnek-e a bőrrel, akumulálódnak-e benne.

Kulcsszavak: Franz cella, FTIR, humán epidermisz, penetrációfokozás.

Bevezetés

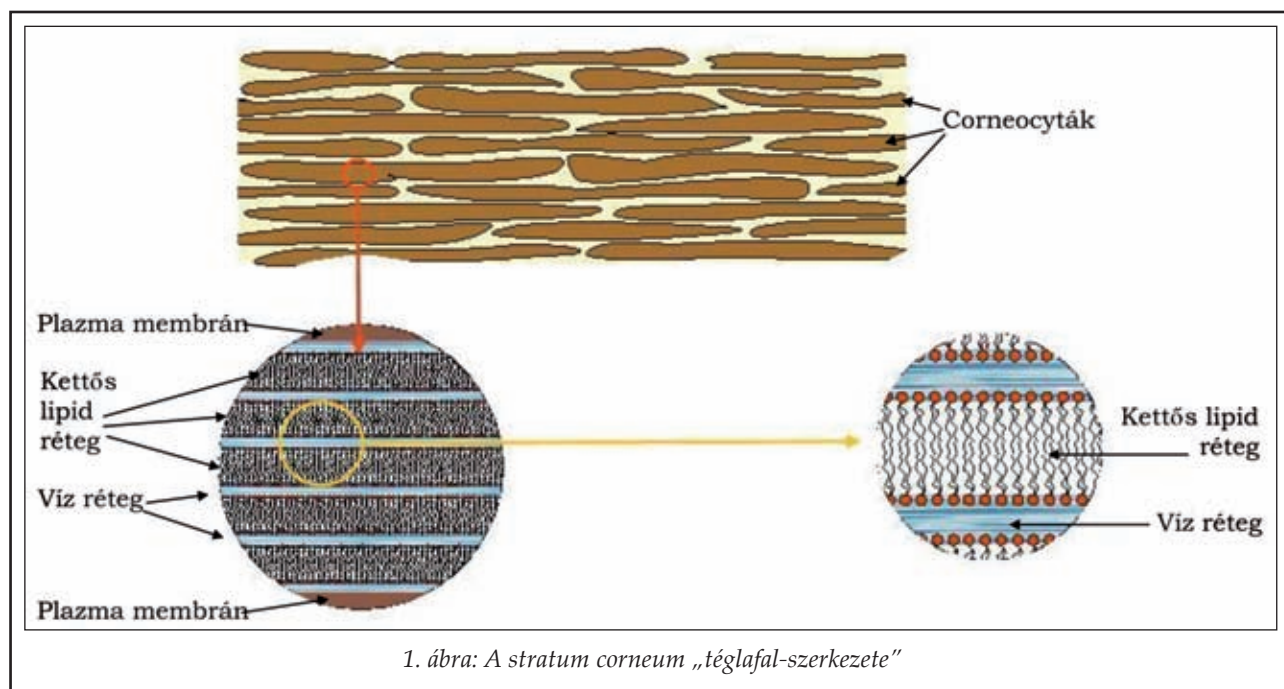
Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a gyógyszeres bőrön keresztüli alkalmazása, ami számos hatóanyag esetében előnyt jelenthet az orális bevitellel szemben. Népszerűségének legfőbb oka, hogy elkerülhető vele a máj metabolizáló hatása, ezáltal a hatóanyag jobb biohasznosíthatóságát eredményezheti. Továbbá csökken az orális alkalmazás esetén tapasztalható plazma csúcskoncentráció, így a mellékhatások is mérséklődnek [1].

A fő probléma azonban az alternatív kapukon keresztüli hatóanyag bevitellel, hogy csak kevés hatóanyag képes leküzdeni a szervezet védő barrierjeit, melyek közül az egyik legjelentősebb a bőr. A bőr barrier funkciójáért a legkülső rétege, a

stratum corneum (SC) felelős. Ezen rétegre az úgynevezett „tégla-fal-szerkezet” jellemző, ahol a „tégla-láknak” elszarusodott, sejtmag nélküli corneocyták felelnek meg. Közöttük pedig lipid- és vízrétegek helyezkednek el (1. ábra).

A SC alapvető funkciója, hogy barrier képezzen az idegen anyagok és a párolgó víz számára. A szigorúan rendezett struktúrájának és kitűnő diffúziós ellenállásának köszönhetően azonban számos hatóanyag bejuttatását megnehezíti, olykor lehetetlenné teszi. A bőrön keresztüli diffúziós folyamatok megértése elengedhetetlen a transzdermális gyógyszerhordozó rendszerek fejlesztéséhez [2].

A perkután hatóanyag permeáció magába foglalja a bőrfüggelékeken (szórtüsző, verejtékmirigy)



és az intakt epidermiszen keresztüli diffúziót. Az intakt epidermiszen keresztül transzcelluláris úton, a corneocytákon és a köztük levő lipideken keresztül, valamint intercelluláris úton, a corneocyták közötti járatokban diffundálhat a hatóanyag (2. ábra) [3].

Leggyakrabban a hatóanyag intercelluláris úton történő permeációja valósul meg. A kettős lipid szerkezetből adódik, hogy ez az út a hidrofíls és a lipofíls karakterű hatóanyagok számára egyaránt lehetőséget biztosít. Általánosan elfogadott tény, hogy a transzdermális hatóanyag bevitelhez olyan nemionos anyagok a legalkalmasabb jelöltek, me-

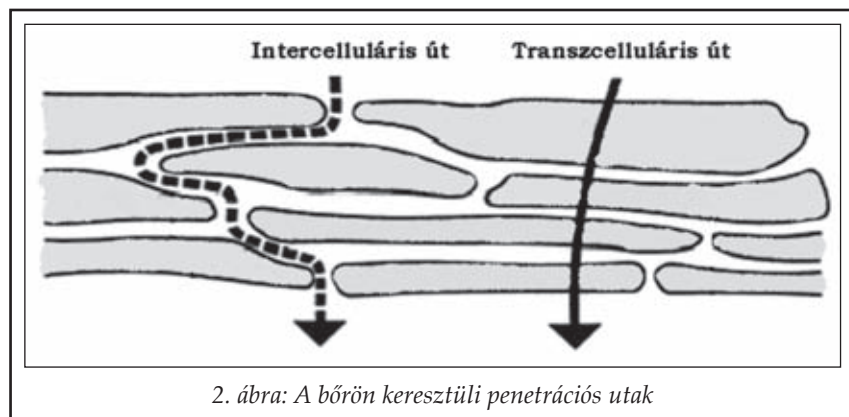
lyek alacsony olvadáspontúak (< 200 °C), alacsony molekulatömegűek (< 500 Da), és megfelelő oldékonysággal (logP: 1–4) rendelkeznek a SC lipofíls régiójában ahhoz, hogy átdiffundáljanak, és még kellően hidrofíls karakterűek ahhoz, hogy az élő epidermiszben képesek legyenek megoszlanak [4]. Az ezen kritériumoknak megfelelő hatóanyagok száma meglehetősen kevés. Penetrációfokozó technikák alkalmazásával azonban javítható a hatóanyagok perkután permeációja [5]. A penetrációfokozás leggyakrabban alkalmazott stratégiáit az I. táblázat foglalja össze [6].

A cél, hogy a különböző technikák közül meg-

I. táblázat

Transzdermális penetrációfokozási stratégiák

Hatóanyag-hordozó kölcsönhatása	<ul style="list-style-type: none"> • Megfelelő hatóanyag/prodrug • Kémiai potenciál • Ionpár/koacervátumok • Eutektikus rendszerek
Hordozók és részecskék	<ul style="list-style-type: none"> • Liposzómák, nioszómák, transzferoszómák, mikroemulziók és nanoemulziók, solid lipid nanopartikulumok • Nagy sebességű részecskék
Stratum corneum módosítása	<ul style="list-style-type: none"> • Hidratáció • Kémiai penetrációfokozók
Stratum corneum elkerülése vagy eltávolítása	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrotűk alkalmazása • SC eltávolítása • Hatóanyag szőrtüszőn keresztüli szállítása
Elektromosságon alapuló módszerek	<ul style="list-style-type: none"> • Ultrahang • Iontoforézis • Elektroporáció (elektropermeabilizáció) • Magnetoforézis • Fotomechanikus hullámok



cukorészterben, annál kisebb a HLB érték. Kedvező tulajdonságaik közé sorolható, hogy nem toxikusak, nem irritálják a bőrt és biodegradálhatók [13]. Így használhatók dermális és transzdermális készítményekben. Irodalmi adatok alapján hatékony abszorpció- és penetrációfokozó tulajdonságúak [14, 15]. A 12 szénatomszámú alkil lánc mutatja a leghatékonyabb membrán permeabilitást, mivel a C12-es

lánc közepes olaj/víz oldékonysága révén képes penetrálni a kettős lipid rétegbe [16].

A bőrön keresztüli hatóanyag permeáció modellezésére alkalmazható membránok

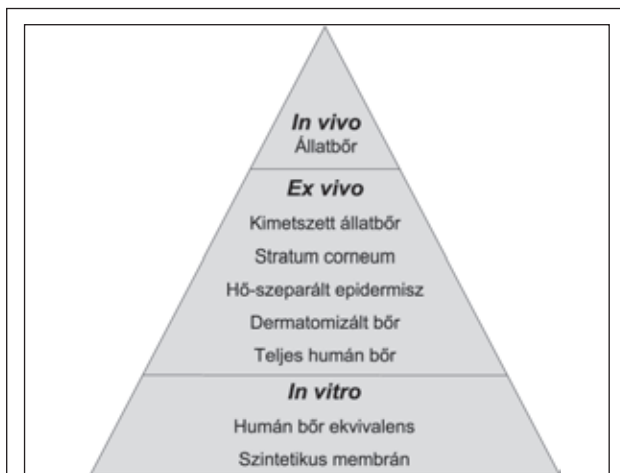
A bőrön keresztüli permeáció modellezésére a szintetikus membránok mellett humán és állati bőrmembránok is alkalmazhatók. A leggyakrabban használt transzdermális hatóanyag permeációs membrán modelleket az 3. ábra foglalja össze.

Ezen vizsgálatok leggyakrabban *szintetikus membrán*on keresztül történnek *in vitro*. Általánosságban elmondható, hogy ez a membrán a biológiai membránokhoz képest permeábilisabb, így hatóanyag felszabadulási és diffúziós vizsgálatokhoz használják. Napjainkban azonban egyre gyakrabban helyettesítik különféle biológiai membránokkal [17]. A transzdermális készítmények fejlesztése során ugyanis nem elegendő membrán diffúziós vizsgálatokat végezni, melyek az átdiffundált hatóanyag mennyiségét mutatják. Elengedhetetlen a biológiai közegen keresztüli permeációs vizsgálata-

találjuk a leghatékonyabb és emellett a legbiztonságosabb módszert, mely nem okoz a SC szerkezetében irreverzibilis károsodást. A rendelkezésre álló módszerek közül a SC módosításán alapuló lehetőségek közül azon kémiai penetrációfokozó anyagok alkalmazása különösen fontos, melyekkel reverzibilisen lehet megnyitni a SC szigorúan rendezett szerkezetét, felfüggeszteni a bőr barrier funkcióját, ezáltal lehetővé téve az egyébként gyengén penetrálódó hatóanyagok bejutását a mélyebb rétegekbe [6]. A kémiai anyagok (Azone, terpének, zsírsavak, alkoholok stb.) megbonthatják a SC rendezett lipid struktúráját, permeábilisabbá téve ezzel azt. Az ionos felületaktív anyagok (pl. decil-metil-szulfoxid, DMSO) a corneocyta keratin tartalmával lépnek kölcsönhatásba, és a protein struktúrát bontják meg. Számos oldószer (propilén-glikol) pedig a kémiai környezet megváltoztatásával módosítja a hatóanyag oldékonysági tulajdonságait, és növeli a megoszlását a szarurétegben [6, 7].

Ígéretes penetrációfokozó anyag lehet a *Transcutol®*, amely hatékony szolubilizáló közeg számos hatóanyag számára, mivel poláris és apoláris oldószerekkel egyaránt elegyedik. Továbbá előnyös tulajdonsága, hogy nem toxikus, biokompatibilis a bőrrel, és humektáns hatással is rendelkezik [8, 9]. Képes vizet abszorbeálni a bőr mélyebb rétegeiből, így növeli a SC víztartalmát, mely ezáltal megduzzad, az intercelluláris lipidek szerkezetük megváltozása nélkül képesek eltávolodni egymástól, és csökken a diffúziós rezisztencia [10, 11, 12].

A *cukorészterek* a nemionos felületaktív anyagok legújabb generációjába tartoznak, és szintén ígéretes penetrációfokozók. A szacharóz észterek hidrofíli részként szacharózt, lipofíli részként zsírsavakat tartalmaznak. A szacharóz 8 hidroxil csoportja 8 zsírsavval észterezhető. Minél nagyobb az észterezettség foka, és minél hosszabb a zsírsavlánc a



3. ábra: Modell membránok a transzdermális hatóanyag permeációs vizsgálatokhoz

II. táblázat

Bőrfelszíni lipidek mennyisége és a SC vastagsága néhány fajban

Fajok	Stratum corneum vastagsága (μm)	Lipidek mennyisége ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
<i>Ember</i>	18,2	60,5
Szörtelen egér	8,8	212,4
Szörtelen patkány	15,4	273,3
Sertés	17,5	130,0
Tengerimalac	18,6	224,7
Kutya	19,9	NK
Marha	30,9	NK
Birka	31,4	NK

NK: nem közölt adat

tok beiktatása is, hiszen a hatóanyag kölcsönhatása a bőrrel és a SC esetleges rezervoár funkciója csak ilyen módon tanulmányozható.

Az *ex vivo* vizsgálatokhoz használható kadáver bőr, de általában redukációs plasztikai műtétek során kimetszett bőrt alkalmaznak. A kísérletek végezhetőek teljes humán bőrön, ami a SC-ből, az élő epidermiszből és a dermiszből áll (2000-3000 μm). Figyelembe kell azonban venni, hogy a permeálódó molekula fiziológiás körülmények között nem minden esetben halad át a teljes dermiszen, a mikrokeringés elszállíthatja.

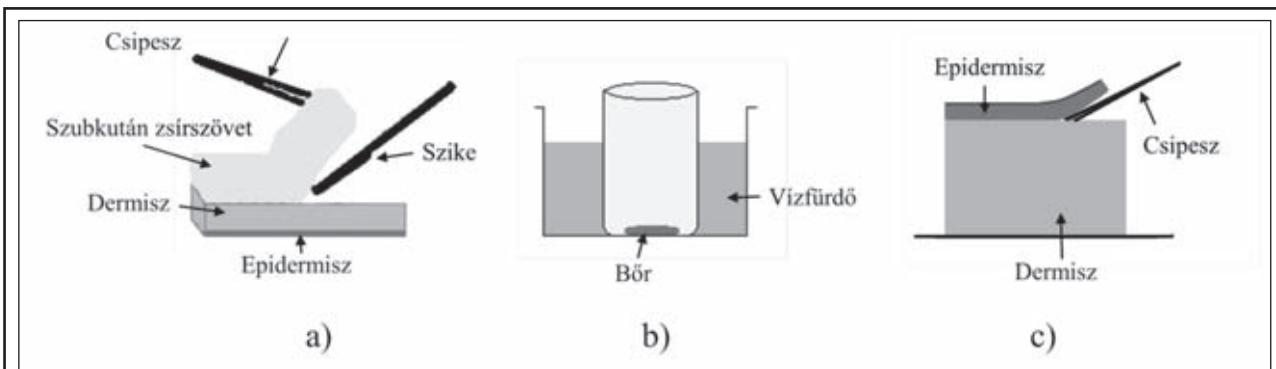
Ennek a problémának a leküzdésére használható dermatomizált bőr, melyet egy speciális, dermatomizációs technikával metszenek, és a SC-on valamint az epidermiszen kívül a dermisznek csak egy részét tartalmazza (400-500 μm) [18].

A dermisz teljes eltávolítására számos mechanikai, termikus és kémiai módszer létezik. A legáltalánosabban alkalmazott technika az epidermisz és dermisz elválasztására a hő-szeparációs eljárás (4b-c ábra), mely a szubkután zsírszövet eltávolítását követően végezhető (4a ábra) [19]. A hő-szeparált epidermisz vastagsága mindössze 20-200 μm .

Néhány esetben csak a *stratum corneum* (10-15 μm) szükséges a vizsgálathoz. Ez az elszarusodott

bőrréteg tripszint használva enzimese emésztéssel izolálható az élő epidermisztől. A művelet során teljes humán bőrt vagy hő-szeparált epidermiszt 37 °C-on 24 órán keresztül tripszin oldatban inkubálnak. Az inkubációs idő elteltével az oldatban csupán az elhalt sejteket tartalmazó SC marad vissza [5].

A humán bőr a legrelevánsabb modell a permeációs vizsgálatokhoz, az elérhetősége azonban limitált. A transzdermális készítmények biohasznosíthatóságának vizsgálatai és a komponensek kockázat értékelése egyre több ilyen jellegű vizsgálatot igényel, így újabb modellek bevonása szükséges. Az irodalom számos állati bőrt javasol ezen vizsgálatok elvégzéséhez a humán bőr kiváltására. Patkány, szörtelen patkány, szörtelen egér, sertés és tengerimalac kimetszett bőrét használják a leggyakrabban *ex vivo* modellként, hogy a humán perkután penetrációt modellezzék. Az állatok bőrének szarurétege azonban különbözik az emberitől vastagságában, a corneocita rétegek számában, a szörtüszők sűrűsége tekintetében, és eltérő lehet a bőrük víztartalma, a lipidek aránya és morfológiája is (II. táblázat) [21, 22]. A majom [23] és a sertés [24] bőrének permeabilitása áll legközelebb az emberi bőréhez. De ezen állatok be-



4. ábra a-c): Humán bőrpriparátum készítése hő-szeparációs eljárással

szerzése drágább és nehezebben megoldható, mint a kisebb laboratóriumi állatoké. Így a legszélesebb körben rágcslók bőrét használják. A szőr hiánya és a csökkent szőrtüszős szám miatt szőrtelen patkány, tengerimalac és eger alkalmazása javasolt, hiszen ezek bőre jobban hasonlít a humán bőrre. A szőrtüszők ugyanis fontos szerepet játszhathatnak a hatóanyag penetrációban, és a szőrös állatokon végzett vizsgálat félrevezető eredményt adhat [25].

Az utóbbi években komoly törekvések folynak különféle alternatív modellek kidolgozására. Ez alapvető fontosságú a humán bőr nehéz elérhetősége és a világszerte növekvő állatkísérletek elleni tiltakozások miatt. A jövőben a *humán bőr ekvivalensek* nyújthatnak megoldást. Ezeket a mesterséges bőroket transzplantációhoz, klinikai sebgyógyításhoz és kémiai anyagok toxikológiai teszteléséhez már használják, de számos típusuk áll vizsgálat alatt, hogy alkalmas modellt biztosítsanak bőr permeációs vizsgálatok során is. Az *EpidermTM*-et (MatTek, USA) és a *Skinethic*-et (Skinethic, Franciaország) közömbös szűrőmembránon növesztik, míg az *Episkin[®]* (L'Oreal, Franciaország) egyrétegű kollagénen tenyésztett bőr [26, 27]. Ezek a szintetikus bőrok élő sejteket tartalmaznak, melyek metabolikusan aktívak, de a legtöbb esetben jóval nagyobb permeabilitást mutatnak, mint a humán epidermisz.

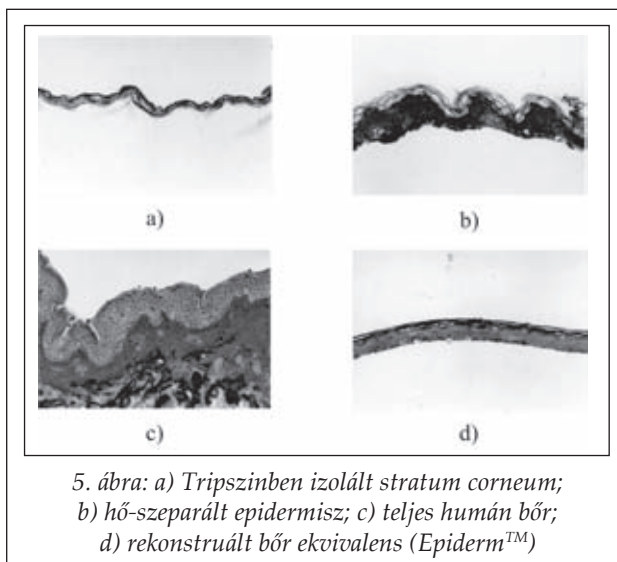
A 5. ábra egy rekonstruált bőr ekvivalens (5d ábra) mikroszkópos metszetét mutatja természetes humán bőr modellekhez (5a-c ábra) hasonlítva [28].

Hatóanyag diffúziós és permeációs vizsgálatok Franz cellával

A hatóanyag vivőanyagból való felszabadulásának, bőrbe jutásának, illetve membránon keresztüli diffúziójának modellezésére a vertikális Franz diffúziós cella (Hanson Microette TM Topical & Transdermal Diffusion Cell System, Hanson Research Corporation, USA) tekintendő a legelterjedtebb és elfogadottabb módszernek [28].

A donor és az akceptor fázist egy membrán (mesterséges, állati vagy humán) választja el egymástól. Akceptor fázisként 37 °C-ra termosztált foszfát puffer (PBS pH=7,4) alkalmazható, mellyel a fiziológiás keringési körülmények modellezhetők (6. ábra).

A membránon négyzetcentiméterenként átjutott kumulatív hatóanyag mennyiség (Q) idő függvényében ábrázolható. Ennek segítségével meghatározhatók a különböző permeációs paraméterek.



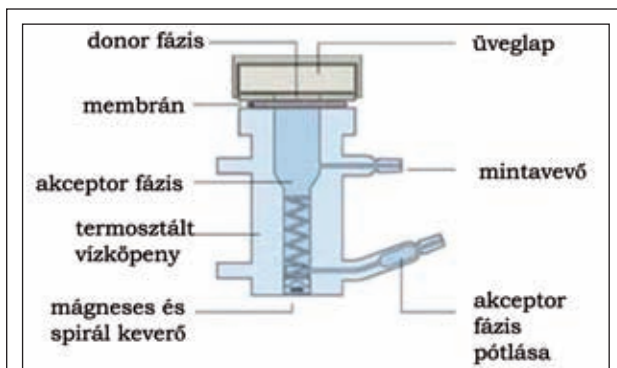
Az idő és az átjutott anyag mennyiségének kapcsolata több fázissal jellemezhető. A *lag time* (T_{lag}) azt a késedelmi időt jelenti, mely a hatóanyag bőrrel történő első kontaktusától a diffúziós egyensúly (*steady state flux*: J) eléréséig eltelik, és a görbe egyenes szakaszának az X tengellyel való metszéspontja adja.

„ J ” az abszorpciós rátát jellemzi egységnyi felületen, mely a görbe egyenes szakaszának meredekségéből határozható meg. A permeabilitási koefficiens (K_p) Fick első törvénye alapján a diffúziós sebesség és a donor fázisban alkalmazott hatóanyag koncentráció (C_d) segítségével az alábbi módon számolható ki [29].

$$K_p = J / C_d \quad \text{1. egyenlet}$$

A penetrációfokozók hatásának jellemzésére az ún. *enhancer index* (EI) szolgál, mely a penetrációfokozót tartalmazó és az anélküli készítmény permeabilitási koefficienséből számítható ki [30].

$$EI = K_{p(\text{penetrációfokozóval})} / K_{p(\text{penetrációfokozó nélkül})} \quad \text{2. egyenlet}$$



6. ábra: A Franz diffúziós cella részéi

Hatóanyag penetrációs vizsgálatok ATR-FTIR spektroszkópiával

Az ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared) spektroszkópia egy hatékony nem-invazív *in vivo* módszer a SC biofizikai szerkezetének molekuláris szinten történő tanulmányozására. Mérési elve az infravörös sugarak bőrben való elnyelődése. Jellemezhető vele a bőr víz, lipid és protein tartalma, tanulmányozható a stratum corneum szerkezetének rendezettsége, nyomon követhető a hatóanyag penetráció, és alkalmas penetrációfokozó segédanyagok hatásmechanizmusának tisztázására. Nagy előnye ennek a technikának, hogy magyarázatot adhat az *in vivo* perkután penetrációfokozás mértékére és mechanizmusára is [31-33].

Az ún. *tape stripping* módszerrel kombinálva pedig nemcsak a SC legfelső rétege jellemezhető, hanem a mélyebb régiókról is információt kaphatunk [34-37]. Egy adhezív tapasz (D-Squame® Skin sampling discs, CuDerm Corporation, USA) segítségével minta gyűjthető a bőr egymás alatti rétegeiből, majd a tapaszt a készülék ZnSe kristályára helyezve, infravörös sugárzással vizsgálható a SC összetétele (7. ábra).

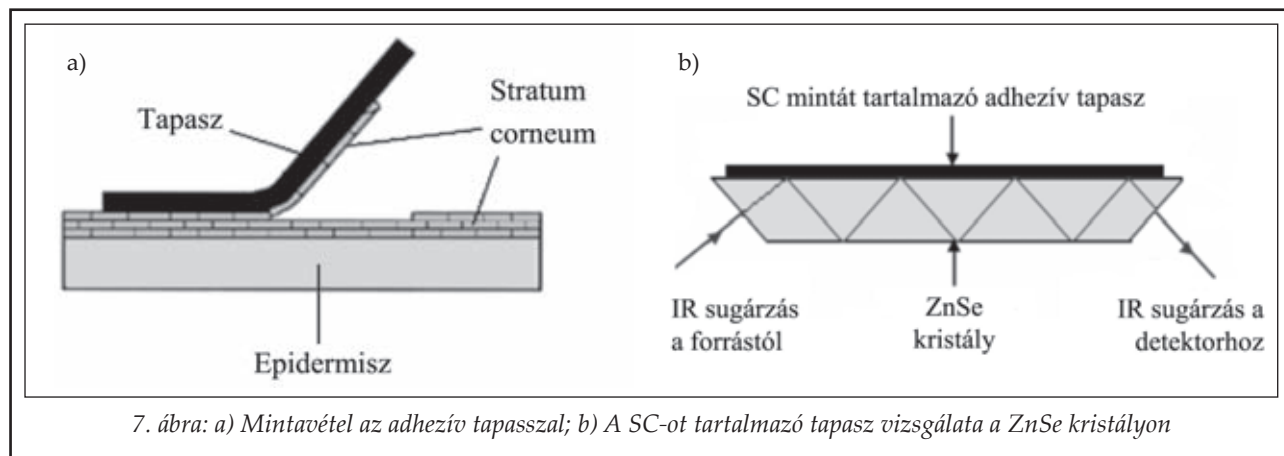
A 8. ábrán a bőr spektruma látható. 3200-3600 cm^{-1} közötti hullámszám tartományban a víz O-H kötéseinek sávjai detektálhatók. Ha ebben a hullámszám tartományban intenzívebb és szélesebb csúcs mutatkozik kezelés hatására, akkor az a bőr hidratálódására utal. A 2920 cm^{-1} -es és a 2850 cm^{-1} -es hullámszámnál a metilén csoportok sávjai ($-\text{CH}_2-$) jelennek meg, amik a SC lipidjeinek a szén-hidrogén láncait jelölik. Ebben a régióban figyelhetjük meg, hogy a bőrön alkalmazott anyagok megbontották-e a SC-ra jellemző szabályos rendezett struktúrát, illetve vontak-e ki lipideket a bőrből. Az amid I illetve amid II abszorpciós csúcsok

az 1650 cm^{-1} -es és az 1550 cm^{-1} -es hullámszámnál a fehérje kötések jelenlétére utalnak. Ezek a frekvenciák érzékenyek a SC proteinjeinek konformáció változására. A különböző penetrációfokozó segédanyagok és a hidratáció hatására bekövetkező lipidstruktúrabeli változások jól követhetők a színképen. Ilyenkor vagy lecsökken a lipidek mennyisége a bőrben a kivonás hatására, vagy megnő a lipid láncok rendezetlensége. A kivonást a csúcsok magasságának és szélességének csökkenése mutatja. Ha a lipidek fluiditása következik be, akkor a csúcs magasabb frekvencia felé tolódik el, a csúcsok kiszélesedéséből pedig a láncok rotációs szabadságának megnövekedésére következtethetünk [38].

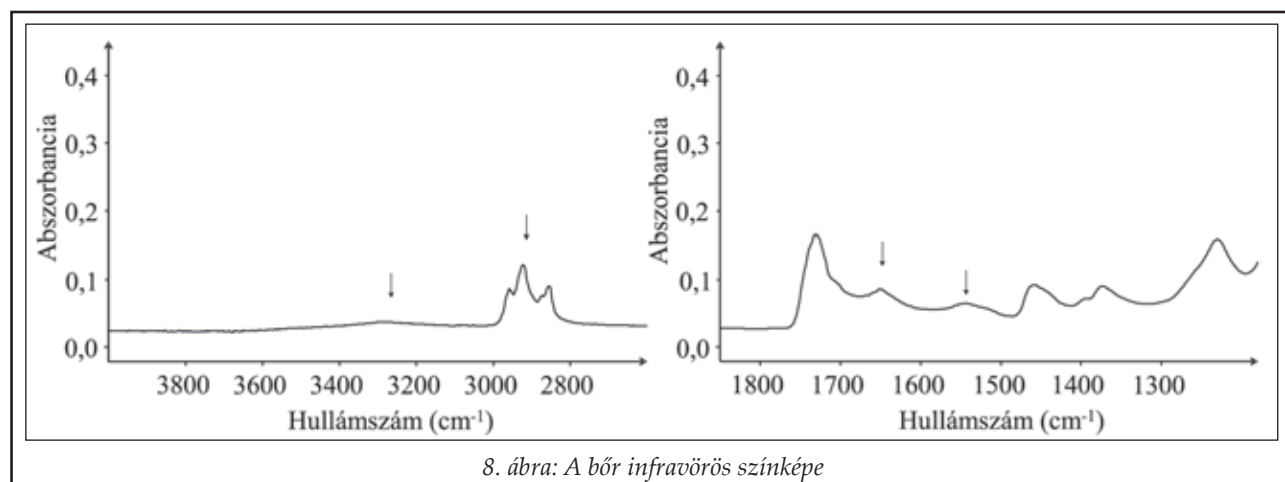
A hatóanyag penetráció vizsgálatára szolgáló membrán kiválasztásának jelentősége

Az SZTE Gyógyszertechológiai Intézetében a nem-szteroid gyulladáscsökkentők közül az Ibuprofen transzdermális permeációját illetve penetrációjának növelési lehetőségeit vizsgáltuk szintetikus membránon keresztül *in vitro*, valamint humán epidermiszen keresztül *ex vivo* [39] és szőrtelen egér bőréen *in vivo* [40]. Tanulmányoztuk a hatóanyag felszabadulását egy penetrációfokozót nem tartalmazó hidrogélből, valamint Transcutol illetve egy cukorészter (Szacharóz-laurát) tartalmú készítményből.

A szintetikus membránon végzett hatóanyag diffúziós vizsgálatok eredményéből megállapítottuk, hogy a Transcutol hatékonyan fokozta az Ibuprofen diffúzióját. A Szacharóz-laurát viszont inkább gátolta a diffúziós folyamatot. Az epidermiszen történő vizsgálatoknál azonban éppen ellenkező eredményre jutottunk. A cukorészter szignifikánsan fokozta a penetrációt, a Transcutol viszont inkább csökkentette [39].



7. ábra: a) Mintavétel az adhezív tapasszal; b) A SC-ot tartalmazó tapasz vizsgálata a ZnSe kristályon



8. ábra: A bőr infravörös színekepe

Ez az érdekes vizsgálati eredmény a két penetrációfokozó eltérő hatásmechanizmusából adódik. A Szacharóz-laurát a bőr szerkezetében okoz enyhe változásokat, a hosszú szénhidrogén láncai kölcsönhatásba léphetnek a SC lipidjeivel, csökkentve a barrier funkciót [41]. Ez az oka annak, hogy *ex vivo*, humán epidermiszen befolyásolja a bőrpenetrációt, szintetikus membránon keresztül *in vitro* azonban nincs hatása. A Transcutol a hatóanyag barrierben való oldékonyságát fokozza. Ezenkívül humektáns hatással is rendelkezik, megnöveli a bőr és a donor fázis víztartalmát, és a donor kompartment változása befolyásolhatja az oldékonyságot és a hatóanyag termodinamikai aktivitását [42]. A Transcutolról azonban azt is leírták, hogy megnöveli némely helyileg alkalmazott hatóanyag akkumulációját a bőrben, így nem minden esetben fokozza a transzdermális permeációt. Az általunk tapasztalt csökkent permeáció oka is ez a depó képződés lehet. A SC intercelluláris lipidjei megduzzadnak anélkül, hogy változást idéznének elő a bőr speciális kettős lipid szerkezetében, és ezek a megduzzadt lipidek tartják vissza elsősorban a lipofil karakterű hatóanyagokat. Ezáltal az Ibuprofen is felhalmozódik a SC-ban, és csökkent transzdermális permeációt eredményez *ex vivo* [44].

Az *in vivo* FTIR analízist a permeációs vizsgálatokban tapasztaltak alátámasztására végeztük [43]. A Transcutol tartalmú gélnél kiemelkedően magas értéket találunk a SC legfelső rétegében, ami alátámasztja azon feltételezésünket, miszerint a hatóanyag a bőrben akkumulálódik és depót képez. A vizsgálatok eredménye továbbá azt mutatja, hogy a Szacharóz-laurát tartalmú készítménnyel jelentős mértékű bőrhidratációt és hatóanyag penetráció növekedést tudtunk elérni, jelentősebb irreverzibilis bőrszerkezeti változás nélkül [40].

Összegzés

Vizsgálati eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a dermális készítmények fejlesztése során a célnak megfelelő membrán megválasztás alapvető fontosságú. Ha a készítmények fejlesztése során alkalmazott segédanyagok az epidermisz szerkezeti elemeivel kölcsönhatásba lépve fejtik ki penetrációfokozó hatásukat, akkor a szintetikus membrán nem elegendő a hatóanyag permeációs vizsgálatok elvégzéséhez. Ezen vizsgálatok során tájékoztató információt kaphatunk a hatóanyag hordozóból történő felszabadulásának kinetikájáról, és a diffúzió sebességéről, de elengedhetetlen a bőrön keresztüli vizsgálatok elvégzése is, hogy informálódjunk arról is, hogy a hatóanyag és a segédanyagok kölcsönhatásba lépnek-e a bőrrel, akkumulálódnak-e benne, valamint a penetrációfokozó segédanyagok hatásmechanizmusát is fel tudjuk deríteni. A penetrációs vizsgálatok oki hátterének megvilágítására az FTIR technika alkalmas módszer.

Köszönetnyilvánítás

A munka a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005 azonosító számú, „Kutatóegyetemi Kiválósági Központ létrehozása a Szegedi Tudományegyetemen” című projekt és az NKTH - A*STAR <Hungarian - Singaporean> Bilateral S&T International Co-operation (BIOSPONA) TeT-08-SG-STAR támogatásával készült.

IRODALOM

1. Cevc, G.: Expert. Opin. Inv. Drug 6, 1887-1937 (1997).
2. Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., Korting, H.-Ch.: Adv. Drug Deliver. Rev. 59, 427-443 (2007).
3. Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 52, 103-112 (2001).

4. Benson, H.A.E.: *Curr. Drug Deliv.* 2, 23-33 (2005).
5. Carsten Ehrhardt and Kwang-Jin Kim: *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models*, Springer, New York Ulrich F. Schaefer, Steffi Hansen, Marc Schneider, Javiana Luengo Contreras, and Claus-Michael Lehr: *Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing* (2008).
6. Barry, B.W.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 101-114 (2001).
7. Thong, H.-Y., Zhai, H., Maibach, H.I.: *Skin Pharmacol. Phys.* 20, 272-282 (2007).
8. Mura, P., Faucci, M.T., Bramanti, G., Corti, P.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 9, 365-372 (2000).
9. Mura, S., Manconi, M., Sinico, Ch., Valenti, D., Fadda, A.M.: *Int. J. Pharm.* 380, 72-79 (2009).
10. Ganem-Quintanar, A., Lafforgue, C., Falson-Rieg, F., Buri, P.: *Int. J. Pharm.* 147, 165-171 (1997).
11. D'Arpino, S., Corbrion-Archer, V., Marty, J.-P., Lantieri, L., Vincent, C.-M., Astier, A., Paul, M.: *Drug Develop. Res.* 58, 283-290 (2003).
12. Harrison, J.E., Watkinson, A.C., Green, D.M., Hadgraft, J., Brain, K.: *Pharm. Res.* 13, 542-546 (1996).
13. Csóka, G., Marton, S., Zelko, R., Otomo, N., Antal, I.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 233-237 (2007).
14. Lehmann, L., Keipert, S., Gloor, M.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 129-136 (2001).
15. Ganem-Quintanar, A., Quintanar-Guerrero, D., Falson-Rieg, F., Buri, P.: *Int. J. Pharm.* 173, 203-210 (1998).
16. Ayala-Bravo, H.A., Quintanar-Guerrero, D., Naik, A., Kalia, Y.N., Cornejo-Bravo, J.M., Ganem-Quintanar, A.: *Pharm. Res.* 20, 1267-1273 (2003).
17. Haigh, J.M., Smith, E.W.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 2, 311-330 (1994).
18. Franz, T. J., Lehman, P. A., Raney, S. G., Cetero: www.aapsj.org/abstracts/AM_2008/AAPS2008-003071.PDF
19. Kligman, A.E., Christophers, E.: *Arch. Dermatol.* 88, 702-705 (1963).
20. El Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 34, 203-222 (2008).
21. Magnusson, B.M., Walters, K.A., Roberts, M.S.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 50, 205-227 (2001).
22. Wester, R.C., Noonan, P.K., Maibach, H.I.: *Arch. Dermatol. Res.* 267, 229-235 (1980).
23. Reifenrath, W.G., Chellquist, E.M., Shipwash, E.A., Jed-erberg, W.W.: *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, S224-S230 (1984).
24. Nolan, L.M.A., Corish, J., Corrigan, O.I., Fitzpatrick, D.: *Int. J. Pharm.* 341, 114-124 (2007).
25. Netzlaff, F., Kaca, M., Bock, U., Haltner-Ukomadu, E., Meiers, P., Lehr, C.-M., Schaefer, U.F.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 127-134 (2007).
26. Rai, V., Ghosh, I., Bose, S., Silva, S.M.C., Chandra, P., Michniak-Kohn, B.: *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 20, 75-87 (2010).
27. Wagner, H., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M., Schaefer, U.F.: *J. Control. Release* 75, 283-295 (2001).
28. Siewert, M., Dressman, J., Brown, C.K., Shah, V.P.: *FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms*. AAPS Pharm. Sci. Tech. 4, 1-10 (2003).
29. Schroeder, I.Z., Franke, P., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M.: *J. Control. Release* 118, 196-203 (2007).
30. Vaddi, H.K., Ho, P.C., Chan, Y.W., Chan, S.Y.: *J. Control. Release* 81, 121-133 (2002).
31. Bernard, G., Auger, M., Soucy, J., Pouliot, R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1317-1323 (2007).
32. Boncheva, M., Damien, F., Normand, V.: *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1344-1355 (2008).
33. Dias, M., Naik, A., Guy, R.H., Hadgraft, J., Lane, M.E.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1171-1175 (2008).
34. Bommannan, D., Potts, R.O., Guy, R.H.: *J. Invest. Dermatol.* 95, 403-408 (1990).
35. Brancalion, L., Bamberg, M.P., Sakamaki, T., Kollias, N.: *J. Invest. Dermatol.* 116, 380-386 (2001).
36. Hahn, T., Hansen, S., Neumann, D., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M., Muys, L., Schaefer, U.F.: *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 183-192 (2010).
37. Thiele, J.J., Traber, M.G., Packer, L.: *J. Invest. Dermatol.* 110, 756-761 (1998).
38. Gremlich, H.U., Yan, B.: *New York: Marcel Dekker* 42, (2001)
39. Csizmazia, E., Erős, G., Berkesi, O., Berkó, Sz., Szabó-Révész, P., Csányi, E.: *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 21, 411-415 (2011).
40. Csizmazia, E., Erős, G., Berkesi, O., Berkó, Sz., Szabó-Révész, P., Csányi, E.: *Pharm. Dev. Technol.* 17, 125-128 (2012).
41. Bolzinger, M.A., Thevenin, Carduner, C., Poelman, M.C.: *Int. J. Pharm.* 176, 39-45 (1998).
42. Ganem-Quintanar, A., Lafforgue, C., Falson-Rieg, F., Buri, P.: *Int. J. Pharm.* 147, 165-171 (1997).
43. Godwin, D.A., Kim, N.-H., Felton, L.A.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 2327 (2002).

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása

SEBE ISTVÁN¹, SZABÓ BARNABÁS^{2*}, ZELKÓ ROMÁNA³

¹Magkémiai Laboratórium, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, Pázmány P. sétány, 1/A.- 1117

²Richter Gedeon Nyrt., Termékfejlesztési Igazgatóság, Budapest, Gyömrői út 17-21. – 1103

*Levelezési cím:

szabobarna@gytk.sote.hu

³Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, Hőgyes E. u. 7-9. – 1092

e-mail: zelrom@gytk.sote.hu

Summary

Sebe, I., Szabó, B., Zelkó, R.: **Positron Annihilation Lifetime Spectrometry (PALS) and its pharmaceutical applications**

PALS is one of the most widely used „nuclear probe” techniques for the tracking of the structural characteristics of materials. The method is based on the matter-energy equivalence principle recognized by Einstein: the electrons and positrons as particle-antiparticle pairs disappear in mutual destruction of particles, they annihilate with high-energy γ -radiation, thus „particle-energy transition” occurs. The properties of the resulting radiation exactly correspond to the relevant properties of the electron and positron preceding the annihilation. Since electrons occur in all types of materials, the phenomenon of positron annihilation can play in any environment; consequently the method can be used for the analysis of each type of materials (crystalline and amorphous, organic and inorganic, biotic and abiotic).

The present paper provides an overview of the theoretical physical background, the practical realization and evaluation of methods, their limitations, and summarizes the pharmaceutical applications published in the recent years.

Keywords: positron annihilation lifetime spectrometry, Doppler-broadening, microstructure, compatibility

Összefoglaló

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia a „nukleáris szondás” anyagszerkezeti vizsgálati módszerek egyik széleskörűen alkalmazható eljárása. A módszer alapja az Einstein által felismert anyag-energia egyenértékűségi elv érvényesülése: az elektronok és a pozitronok részecske-antirészecske párként egymás kölcsönös megsemmisítése közben részecskeként eltűnnek, annihilálódnak, helyettük-bőlőlük azonban nagyenergiájú γ -sugárzás keletkezik: a „részecske-állapot” átalakul „energia-állapottá”. A keletkező sugárzás tulajdonságai összességükben pontosan megfelelnek az annihilációt megelőzően az elektron és pozitron megfelelő sajátosságainak. Minthogy elektronok minden anyagban előfordulnak, ezért a pozitron-annihiláció jelensége bármiféle környezetben lejátszódik, ezért, mint módszerrel, minden lehetséges anyagtípus (kristályos és amorf, szerves és szervetlen, élő és élettelen) tanulmányozható. A dolgozat áttekintést nyújt a módszer elméleti fizikai hátteréről, a mérések gyakorlati megvalósításának és kiértékelésének módszereiről, korlátairól, valamint összefoglalja a közelmúltban megjelent gyógyszerészeti alkalmazásokat is.

Kulcsszavak: pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia, Doppler-szélesedés, mikroszerkezet, kompatibilitás

Bevezetés

A PALS elméleti háttere

Az antianyag

Az antianyag létezését először Paul Dirac jósolta meg 1928-ban kidolgozott, az anyag viselkedését leíró relativisztikus egyenlete alapján [1, 2]. Elmélete szerint léteznie kell olyan szubatomi részecskének, melyeket még kísérletek során nem észleltek, így például a negatív töltésű protonnak, pozitív töltésű (későbbi elnevezéssel: antielektron, pozitron) és elektromosan semleges elektronnak [3] (elektron-neutrínó, ν_e) is. Utóbbiak létezését közvetlen módon 1956-ban bizonyították Frederick Reines és munkatársai, melyért 1995-ben Nobel-díjat kaptak [4].

Az általunk ismert Világegyetemben az „anyag” került túlsúlyba az antianyaggal szemben, melynek magyarázata mai napig a fizikusok kutatásának homlokterében van, ugyanis szimmetria elvek szerint, az Univerzumnak anyagot és antianyagot egyenlő mértékben kellene tartalmaznia. A szimmetria sértés mértékére az anyagi részecskék (kb. 10^{78} db), illetve a fotonok számának (kb. 10^{87} db) arányából következtethetünk, ez alapján minden 1 milliárd antianyag részecskére 1 milliárd és még 1 darab „anyag”-i részecske jutott az Ősrobbanás pillanatában.

Elméleti megfontolások alapján egy antianyagból álló Világegyetem a miénktől semmilyen lényeges aspektusában nem különbözik, az ott élő valószínűleg szintén „anyag”-ból felépülőnek nevezik a világukat.

A pozitron

A pozitron (e^+) az elektron (e^-) antirészecskéje, tehát a tömege és a spinje az elektronéval azonos, töltése és leptontöltése az elektronéval ellentétes. 1932-ben *Carl David Anderson* ködkamra kísérletekkel bizonyította egy pozitív töltésű, elektronnal azonos tömegű részecske létezését, illetve igazolta, hogy a felfedezett részecske az elektron antirészecskéje [5]. Az antianyag, így a pozitron sorsa is az anyagból álló világunkban a teljes megsemmisülés, az annihiláció felé halad. E folyamat során az anyag-antianyag teljes tömege energiává (tömeggel nem rendelkező fotonokká) alakul, a híressé vált $E = mc^2$ egyenlet alapján, ahol az m a részecske tömege, a c a fénysebesség, az E pedig a felszabaduló energia. Ez a folyamat melléktermék nélkül, 100%-os hatásfokkal termel energiát, így az energetikai kutatások kedvelt irányává vált. Jelen technológiáinkkal azonban az antianyag előállítás, tárolása, az annihiláció szabályozása illetve a keletkező hatalmas energiamennyiség felhasználása túl költséges, a befektetett energia nem térül meg [6]. Az e^-e^+ annihiláció során keletkező általában két foton egymással 180° -os szögben távozik, ez a jelenség felhasználható kutatási célokra, ez az orvos-diagnosztika kedvelt háromdimenziós képalkotó eljárásának, a PET-nek (*positron emission tomography*) az elméleti alapja [7].

A pozitronium-atom

Az elektron-pozitron kölcsönhatás egy további lehetséges formája, tulajdonképpen csupán az annihilációt megelőző, közbülső lépése, hiszen az antianyagnak ez a sorsa elkerülhetetlen, egy hidrogénatom-szerű, ún. pozitronium-atom kialakulása. Alapvető különbség azonban a H-atomhoz képest, hogy itt nem egy gyakorlatilag mozdulatlan (Born-Oppenheimer-közelítés [8]) pozitív töltésű magot képzelhetünk el, hanem két, egymás körül, azonos pályán „keringő”, egyenlő tömegű testet. A pozitroniumnak két formája létezik, ha pozitron és az elektron spinje azonos ($+1/2$ vagy $-1/2$), tehát a pozitronium spinje ± 1 , akkor ortopositroniumnak (o-Ps), ha spinjük ellentétes, így az eredő spin 0, akkor para-positroniumnak (p-Ps) nevezzük. A két, 3:1 arányban keletkező [9] forma viselkedése alapvetően különbözik egymástól, a p-Ps sorsa az egymásba zuhanó kettős-csillagokéhoz hasonló, rövid idő alatt, vákuumban 125 ps, 2 foton kibocsátása közben annihilálódik a pozitron-elektron pár. Az o-Ps ezerszeresen túléli a

p-Ps-ot, mivel a spin-tiltás meggátolja az annihilációt. Ez a gátlás azonban nem elég erős, az o-Ps is megsemmisül, azonban nem 2, hanem 3 foton keletkezése közben. Vákuumban 142 ns az életideje, ez azonban polimerekben néhány ns-ra csökken, mivel a környezetében lévő, a pozitronéval ellentétes spinű elektronnal ún. pick-off annihilációt szenved, a p-Ps-hoz hasonlóan 2 foton kibocsátása közben. Ezt a pick-off annihilációt használjuk a polimer rendszerek üregméret viszonyainak tanulmányozására, hiszen minél kisebb üregbe jut be az o-Ps atom, mozgása során annál hamarabb találkozik egy ellentétes spinű elektronnal [10].

A Doppler-effektus

A Doppler-effektus a hétköznapi életben gyakran tapasztalt, jól ismert jelenség, melynek alapja a sugárzást (legyen az hang, látható fény vagy más elektromágneses sugárzás), kibocsátó forrás és a létrehozott sugárzás összemérhető sebessége, amely külső szemlélőben (akihez képest a forrás mozog) a sugárzás hullámhosszának, energiájának változásának érzetét kelti. Hanghullámok esetében, melyekkel a Doppler-effektust először bizonyították, a hang mélyülését, illetve magasodását tapasztalhatjuk, miközben a hangforrás közeledik, vagy éppen távolodik tőlünk. Csillagászatban ugyanezt a hatást figyelhetjük meg a csillagok színének megváltozásában, mivel az égítetek mozgása a fénysebességgel összemérhető, a hozzánk közeledő objektumok színe vörös irányba (kisebb energia), míg a távolodóké kék irányba (nagyobb energia) tolódik el.

Jelen esetben a sugárzás maga a kibocsátott foton, míg a forrás az annihilációban részt vevő elektron. A fentiek alapján belátható, hogy ha az elektronnak a mintában számottevő sebessége, lendülete, kinetikus energiája volt, akkor ez a kibocsátott fotonok energiájához (irányától függő előjellel) hozzáadódik. Tehát, ha mérni tudjuk az annihilációs fotonok energiáját, képet kaphatunk a minta elektronjainak impulzusáról, így arról, hogy azok kötésben, nemkötő párban vannak-e jelen, a vizsgálandó anyagban kialakult-e új kötés (pl. hidrogén-kötés a polimer rendszer alkotói között). A mérést azt teszi lehetővé, hogy az észlelt Doppler-szélesedés a γ -detektor energia-felbontásánál nagyobb [7].

Amennyiben nem lenne Doppler-effektus, két pontosan 511 keV-os foton keletkezését mérnénk, mivel az elektron és a pozitron nyugalmi tömege is:

$$m(e^+) = (510,99906 \pm 0,00015) \text{ keV}/c^2, \quad [7]$$

ehelyett az 1. ábrán látható, 511 keV-os csúccsal rendelkező, aszimmetrikus eloszlásgörbét kapunk. Az aszimmetria oka a Compton-szóródás, mely során az annihilation fotonok a környezet elektronjain rugalmatlanul szóródnak, így energiát veszítenek, növelik a csúcsnál kisebb energiáknál (görbe bal oldala) tapasztalható hátteret.

A PALS gyakorlati megvalósításának lehetőségei

Pozitron források

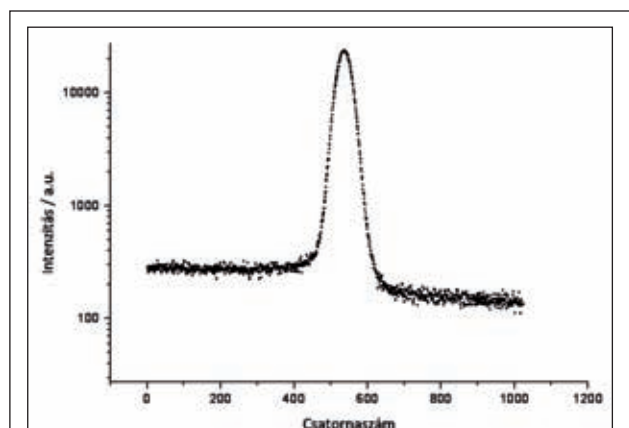
A pozitron kibocsátás (β^+ -bomlás) a protonban gazdag magok elektron-befogással versengő bomlási módja. A folyamat során a „felesleges” proton neutronra, pozitronra és egy neutrínóra bomlik, a ^{22}Na példáján szemléltetve a bruttó egyenletet:



A leánynuklid egy erősen gerjesztett állapotban lévő neon atom, amely az anyanuklid bomlásával szinte egy időben foton-emisszió közben relaxál alapállapotba:

$$t_{1/2} = 3,6 \text{ ps}$$

A laboratóriumban leggyakrabban használt pozitronforrás a 22-es tömegszámú nátrium [11–13], melyet $^{22}\text{NaCl}$ vagy ritkábban $^{22}\text{Na}_2\text{CO}_3$ [14] só formában alkalmazunk. A ^{22}Na felezési ideje viszonylag hosszú, 2,6 év, olcsón beszerezhető, pozitron kibocsátása közben ^{22}Ne -re bomlik, amely alapállapotába relaxál 1274 keV-os gamma-foton keletkezése



1. ábra: Tipikus Doppler-szélesedés görbe

közben. Így ez a forrás ideális pozitron élettartam mérésére, viszont más alkalmazásoknál (pl. nagy pontosságú Doppler-szélesedés mérés) a neonból származó foton nem szükséges a vizsgálathoz, a hátteret növeli. Ilyen mérésekhez a ^{68}Ge forrás ideális, kis fotonemissziója miatt [15, 16]. Ennél a forrásnál viszont a felezési idő jóval rövidebb (275 nap). Elterjedt forrás még a ^{58}Co , melyet nagy pozitronhozam eléréséhez használnak, rövid felezési idejű (71 nap), de nagy gamma-foton hozama miatt PALS, Doppler-szélesedés (DB) mérésekhez nem használható [17].

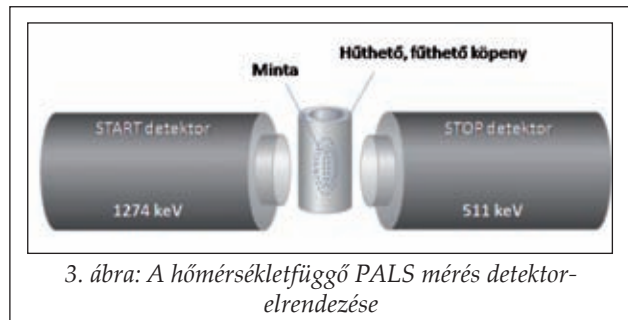
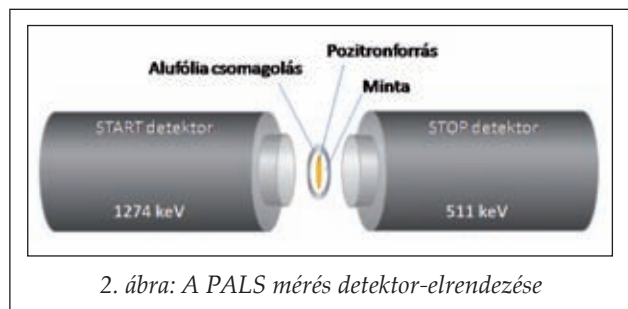
A kis pozitron-energiájú források alkalmazása során problémát jelent, hogy a pozitronok egy része a forrás csomagolásában nyelődik el. Ez a jelenség csökkenthető például ^{44}Ti forrással [16], melynek felezési ideje kb. 60 év [18, 19], de jóval drágább ára miatt a ^{22}Na szinte teljesen kiszorította az élettartam-mérés gyakorlatából [20].

A forrás csomagolására vékony (7 μm) Kapton [21–25] vagy (<5 μm) nikkel fóliát [13] alkalmaznak leggyakrabban, egyrészt a könnyebb kezelhetőség, másrészt a mért minta radioaktív szennyeződésének elkerülése miatt. A csomagolásnak a lehető legvékonyabbnak kell lennie, hiszen a forrás aktív térfogatában helyezkedik el, indokolatlanul vastag anyaga nagy pozitronvesztést és a mérendő mintától független jelet okozna.

Kísérleti elrendezések, mérési körülmények

Élettartamok mérése (PALS)

A hagyományos PALS mérésekhez két, NaI(Tl) [11] vagy BaF_2 [12, 25, 26] érzékelőkristályos szcintillációs (számláló) detektort alkalmazunk. A két detektort a mintához a lehető legközelebb, egymással általában 180° -os szöget bezárva helyezük el (2. ábra). (Ahogy az elméleti háttérből következik, az elhelyezés ezen formája csak a detektálás térszögének maximalizálására szolgál, hiszen a két mérendő foton kibocsátásának nincs szögkorrelációja.) Az egyik detektor a forrásban történő elektronbefogásra (lásd: pozitron keletkezése szakasz) jellemző 1274 keV-os gamma-foton megjelenését detektálja (START jel), míg a másik a pozitron-elektron annihilation 511 keV-os fotonjainak egyikét (STOP jel). A két detektorkristály jelének időbeli különbsége a pozitron, illetve a pozitronium élettartama. A megfelelő detektáláshoz elengedhetetlen optimális erősségű forrás kiválasztása, túlságosan kis aktivitású forrás esetén a mérési idő indokolatlanul hosszúvá válik, míg túl nagy akti-



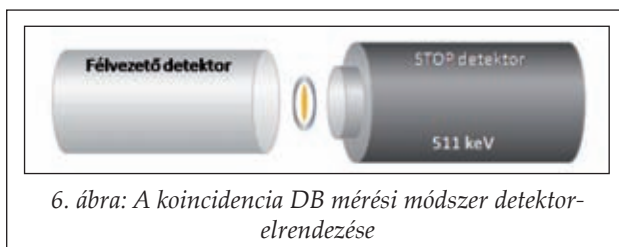
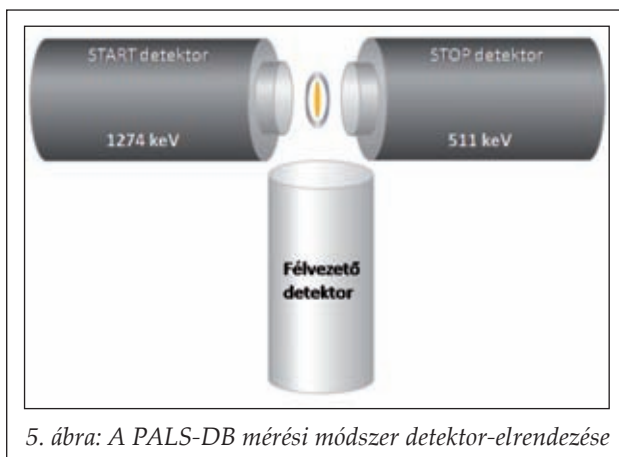
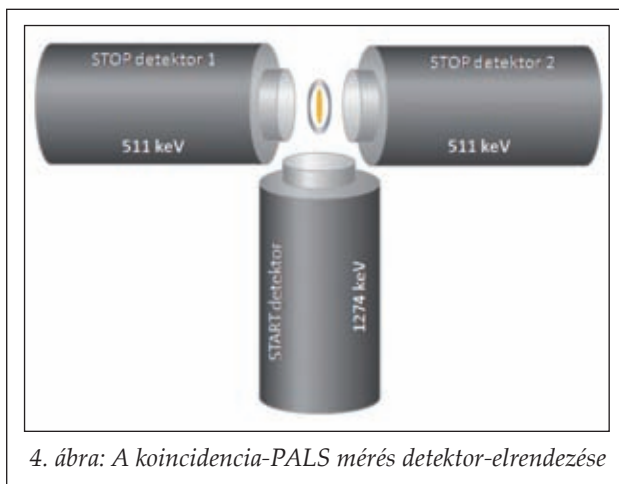
vitás esetén a START és a STOP jel között újabb START jel jelenhet meg, így az élettartamok mérése lehetetlenné válik.

Dinamikus (hőmérsékletfüggő) PALS (temperature dependent PALS)

A PALS mérésekhez egyszerűen használható termosztálható mintatartó, melynek segítségével a vizsgált rendszerek mikroszerkezetének hőmérsékletváltozás hatására bekövetkező átalakulását tudjuk nyomon követni (3. ábra) [24, 27]. Polimer rendszerek esetében az élettartam-hőmérséklet görbére két egyenes illeszthető, metszéspontjuk a DSC módszerrel is mérhető üvegátalakulási hőmérsékletet (glass transition temperature, T_g) adja [28, 29].

Koincidenca PALS

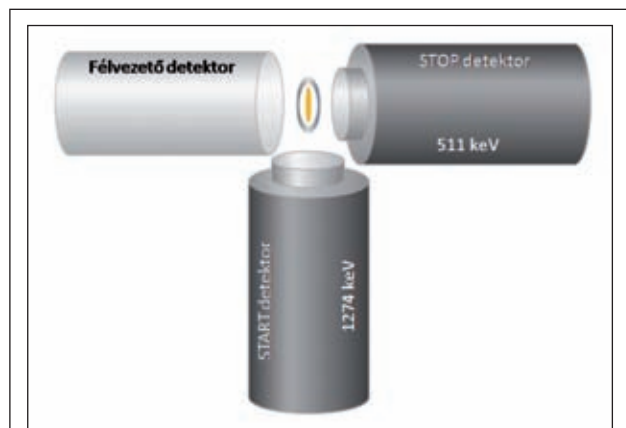
A hagyományos kettő helyett három szcintillációs detektort használva ún. koincidenca PALS vizsgálat végezhető (4. ábra). A három detektor egyike a hagyományos PALS-nál bemutatott START jelet rögzíti, míg a másik két, egymással szemben elhelyezett detektor az annihilációs fotonokat érzékeli. Mivel a két-foton annihiláció esetében a két részecske egymással 180°-os szöget bezáró irányban távozik a mintából, amennyiben a két detektor egyszerre érzékel egy-egy 511 keV-os fotont, azok szinte biztosan a mintában lejátszódó annihiláció során keletkeztek. Ilyen módon csak azokat a STOP jeleket fogadjuk el, amelyeket mindkét de-



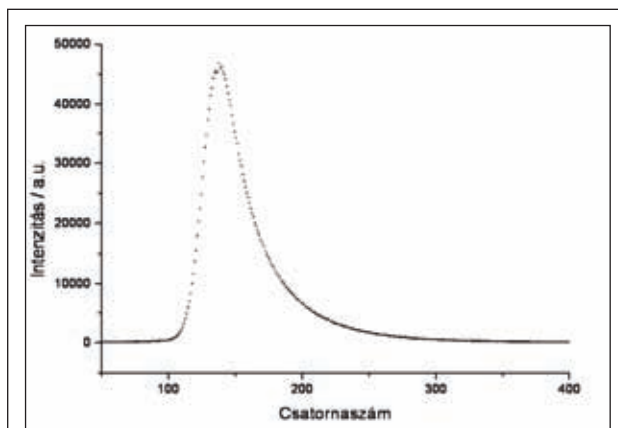
tektor egyszerre érzékelt, ezzel csökkentve a más forrásból származó fotonok által generált mérési hibát, a háttérrel [11]. Ezt a mérési összeállítást azonban, nyilvánvaló előnyei ellenére, a PALS-hoz képest jelentősen hosszabb mérési idő miatt ritkán alkalmazzák.

Doppler-szélesedés mérés (Doppler-Broadening, DB)

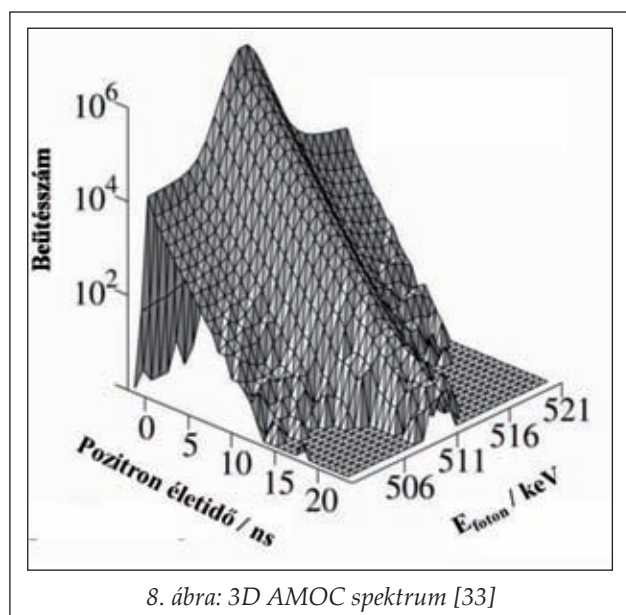
A mérés elvégzéséhez egy félvezető, többnyire HPGe (nagy tisztaságú germánium) detektorra van szükség, amely azonban a szcintillációs detektorokkal ellentétben (folyékony nitrogénes) hűtést igényel, tehát nem csak beszerzése, de fenntartása is költségesebb, mint a számláló detektoroké. A vizsgálatot általában a PALS mérés kiegészítéseként, az-



7. ábra: AMOC mérés detektor-elrendezése



9. ábra: Tipikus PALS élettartam spektrum



8. ábra: 3D AMOC spektrum [33]

zal egy időben végzik a DB detektort a PALS detektorokhoz képest 90°-ban elhelyezve (5. ábra).

Koincidenencia Doppler-szélesedés mérés (Coincidence Doppler Broadening Spectroscopy, CDBS)

A koincidenencia DB a koincidenencia PALS-hoz hasonló megfontoláson alapul, két (általában egy HPGe és egy szcintillációs) detektor alkalmazásával a 180°-os szögben távozó foton-pár energiáját mérjük (6. ábra), így a háttér egy nagyságrenddel csökkenthető, viszont a mérési idő többszöröse a hagyományos DB mérésnek [26, 30, 31]

Élettido-energia korreláció (Age momentum correlation, AMOC)

Az AMOC a PALS és a DB kombinációja (7. ábra), segítségével egy időben mérhető a pozitron-élet-

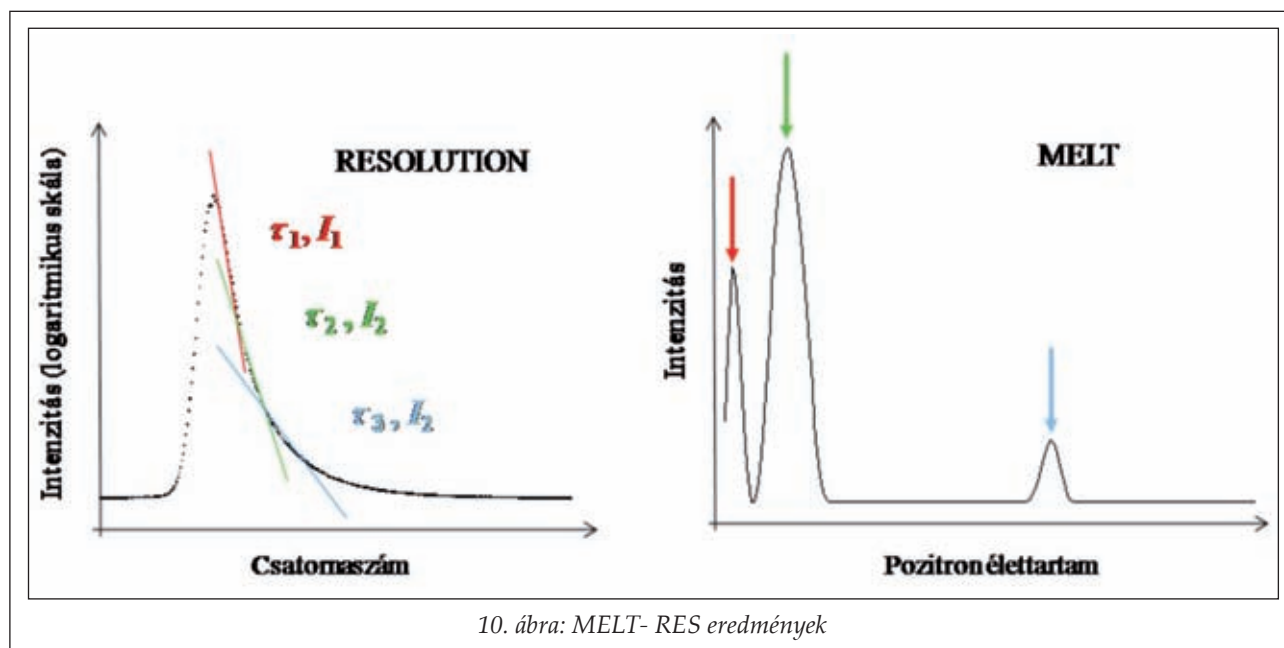
tartam és a keletkező annihilációs fotonok energiája, egy 3D-s ábrán ábrázolható (8. ábra) a pozitron élettartam, az annihilációs fotonok energiája illetve a beütésszám [32]. Alkalmazható hagyományos ^{22}Na forrás és BaF_2 detektor is az élettartamok méréséhez, de általában nagy pozitron hozamú sugárforrást és műanyag, közvetlenül a nagyenergiájú pozitron áthaladását érkező detektort használnak a mérési idő lecsökkentésére [21].

Fő alkalmazási területe az ún. pozitronium-kémia, ezzel a módszerrel meghatározható, hogy a pozitron milyen állapotban van jelen a mintában (szabad pozitron, p-Ps, o-Ps), illetve követhető a formák arányainak változása. A meghatározás alapja a pozitron előfordulási formáinak jellemzően különböző S-paraméterei. A formák közül a p-Ps rendelkezik a legnagyobb S-paraméterrel, hiszen az annihilációban részt vevő elektron kötött állapotban van, kis mozgási energiája csekély mértékben változtatja meg a megsemmisülő rendszer, 2x511 keV körüli energiáját [9, 10, 25].

Kiértékelési módszerek

o-Ps élettartam

A 9. ábrán egy tipikus, hagyományos PALS módszerrel mért spektrum látható. A kiértékelés során a görbe exponenciálisan lecsengő szakaszát bontjuk fel különböző exponenciális függvényekre. Általánosan 2-3 függvény összege már jó közelítéssel megadja az eredeti adatsort. Fémekre [34, 35], ötvözetekre [36], félvezetőkre [12, 30], elektromos áramot vezető anyagokra (pl. grafit [37]), kristályos anyagokra (pl. gyémánt [25, 38]) jellemzően 2 élettido-t kapunk, mivel ezekben o-Ps nem alakul ki [12]. Polimereknél többnyire a 3 élettido a jellemző [22], ezek közül a legnagyobb élettido az o-Ps élet-



10. ábra: MELT- RES eredmények

tartama, de előfordul, hogy a görbét 4 [13, 22] vagy 5 [42] komponensre kell bontanunk a megfelelő illeszkedés eléréséhez.

A görbe felbontására az irodalomban több program is ismert, melyek alapvetően két csoportba oszthatók: diszkrét élettartamot meghatározókra (pl. RESOLUTION [40, 41]), eloszlás függvényt generálókra (pl. MELT [13, 23]).

A programok által számolt eredmények közötti különbséget az 10. ábra szemlélteti, míg a RESOLUTION program a jobb oldalon látható mérési spektrumból 3 élettartamot, illetve az ezekhez tartozó intenzitásokat határozza meg, addig a MELT ugyanabból az adatsorból egy háromcsúcsú eloszlásgörbét számol.

Átlagos élettartam

Az átlagos élettartam ($\bar{\tau}$) a hagyományos PALS mérési eredményeiből számítható ki, gyakorlatilag ez a paraméter a pozitron-élettartamok (τ_n) intenzitásaikkal (I_n) súlyozott átlaga:

$$\bar{\tau} = \sum_{i=1}^n \tau_i \cdot I_i$$

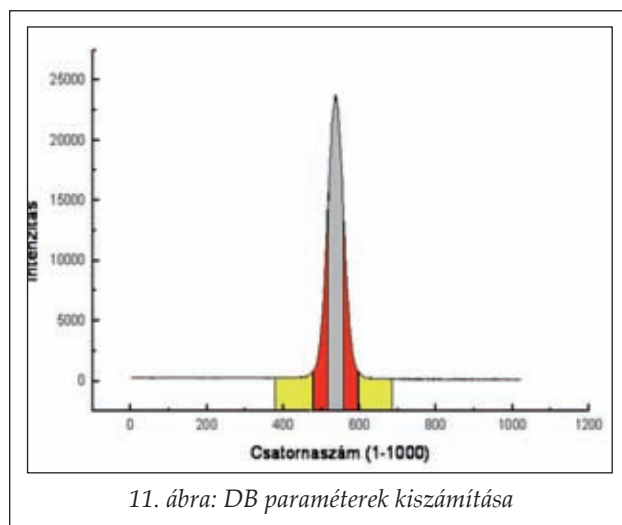
Kiszámítása anyagok interakciójának gyors kimutatására szolgál, hiszen például, ha egy 1:1 arányú porkeverékben az átlagos élettartam nem a komponensek átlagos élettartam értékeinek átlaga, akkor a pozitron nem statisztikusan egyik vagy másik anyagban annihilálódott, a két anyag interakcióba lépett egymással [12].

Élettartamok átszámítása üregméretre

A PALS módszer közvetlen eredménye idő-dimenziójú, azonban ahhoz, hogy ezeket az értékeket más módszerekkel kapottakkal össze lehessen hasonlítani, az élettartamokból térfogat-egységben megadott üregméreteket kell számolnunk. Erre elfogadott módszer az alábbi szemi-empirikus egyenlet:

$$\tau_3^{-1} = 2 \cdot \left[1 - \frac{R}{R_0} + \frac{1}{2\pi} \cdot \sin\left(\frac{2\pi R}{R_0}\right) \right] \quad [22],$$

ahol τ_3 az o-Ps élettartam, R a kiszámítandó üregméret, $R_0 = R + \Delta R$, mely egyenletben ΔR egy empirikus állandó, elfogadott értéke 1,66 Å [42].



11. ábra: DB paraméterek kiszámítása

I. táblázat

Pozitronos módszerrel vizsgált ható- és segédanyagok

Vizsgált anyag	Módszer	Vizsgált tényező hatása
Verapamil-klorid [45]	PALS	hőmérséklet
Kollidon K25 [51]	PALS	relatív nedvességtartalom
PEO [52]	PALS	tárolási időtartam
Carbopol 71G NF [53]	DB	tárolási időtartam
Carbopol Ultrez 10 NF [53]	PALS	tárolási időtartam
Maltodextrin [54]	PALS	hőmérséklet
PEG-PVP [55]	PALS, DB	mélység-profil
PVP-PVAC-PVA [56]	PALS	vinil-acetát-vinil-alkohol arány
PVA [57]	PALS	hőmérséklet
PVA [58]	PALS, DB	jodidion-tartalom
PVA-PES [59]	PALS	PES-tartalom
Keményítő-szukróz [60]	PALS	hőmérséklet

(PVA: poli-vinilalkohol, PES: poliészter, PEO: poli-etilénoxid, PVAC: poli-vinilacetát, PEG: poli-etilénlikol)

DB paramétereinek kiszámítása

A DB módszer leírásánál látott tipikus Doppler-szélesedés görbét egyszerű programokkal értelkelhetjük. Az eredeti spektrum (1. ábra) kétoldali háttérkorrekciója után a görbe csúcsának néhány csatornányi környezetének integrálját (ábrán szürke színnel kiemelve) elosztjuk a teljes görbe integráljával, ez adja az ún. *S*-paramétert, majd a görbe szélének néhány csatornás környezetének integráljával (ábrán sárga színnel kiemelve) is ugyanezt tesszük, ez adja a *W*-paramétert (11. ábra). Ez a két paraméter jelzi a kis és nagy impulzusú elektronok arányát a mintánkban, minél több a kötött állapotban lévő, kis lendületű elektron, annál nagyobb az *S*- és annál kisebb a *W*-paraméter értéke.

Kontroll módszerek

Mint minden analitikai módszert, a PALS-t is szükséges validálni, független módszerrel bizonyítani, hogy amit mértünk (élettartam), illetve amit a mérési eredményekből számolunk (szabad térfogat), a valóságnak megfelel.

A PALS esetében erre több, irodalomban ismert mérési technika is rendelkezésre áll, ezek a következők:

– B.E.T.

A BET módszer nevét az izotermát először leírók (Brunauer, Emmett, Teller) neveinek kezdőbetűiről kapta. Az eljárás során folyékony nitrogénnel (77 K hőmérsékleten) képezünk réteget a minta felszínén, így kaphatunk információt az anyag

fajlagos felületéről, illetve porozitásáról. A BET módszer mikropórusok vizsgálatára kevésbé alkalmas, mivel a N_2 átmérője a Ps-atoménál (1,06 Å) valamivel nagyobb, illetve nem képes behatolni a zárt pórusokba sem. Közepes méretű pórusok esetében a két módszer azonos eredményt ad, mivel a szabadterefogatot meghatározó képlet állandóját (ΔR) a BET mérések alapján állapították meg [13, 43].

– ^{129}Xe Mágneses Magrezonancia Spektroszkópia (Xe-NMR).

A BET-hez hasonló megfontoláson alapul az üregméretek mérése ^{129}Xe NMR-es módszerrel. Xenon gázzal feltöltik a mintát tartalmazó NMR-csővet, a körülbelül 5 atm nyomáson a Xe bediffundál az üregekbe, mért kémiai eltolódása (az NMR-nél használatos ppm egységben, a szabad Xe-gázhoz viszonyítva) az érzékelt üreg méret reciprokával arányos. A mérési módszer hátránya, hogy korrekcióba kell venni az NMR-cső falában elnyelődő Xe kémiai eltolódását, a Xe-atom átmérője 4,4 Å, így a kisebb üregeket nem érzékeli valamint a zárt üregekbe a N_2 -hez hasonlóan nem jut be. Az NMR készülék ára és fenntartási költségei, főként a szupravezető mágnes folyékony héliumos hűtése miatt, sokkal nagyobbak, mint a PALS esetében [22].

– Differenciál pásztázó kalorimetria (differential scanning calorimetry, DSC).

A DSC egy jól ismert termoanalitikai módszer, amely során a vizsgálandó minta hőmérsékletét egy zárt rendszerben változtatjuk, miközben mérjük a hőmérsékletváltozás előidézéséhez

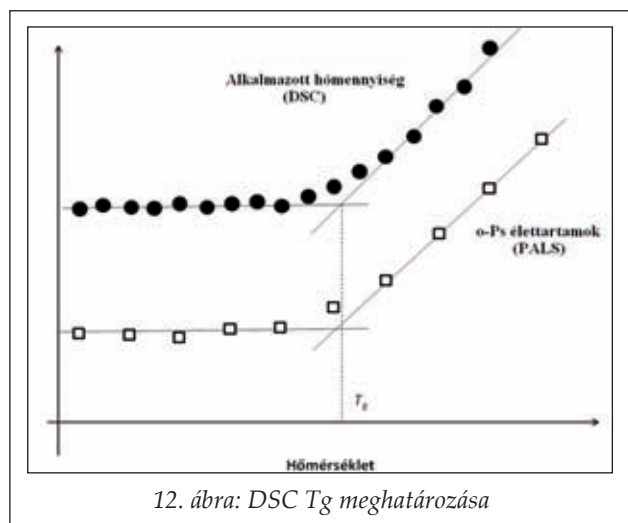
II. táblázat

Pozitronos módszerrel vizsgált polimer hordozó alapú gyógyszerformák

Vizsgált anyag	Forma	Módszer	Vizsgált tényező hatása
polisztrén [46]	film	DB	hőmérséklet, filmvastagság
polisziloxán [61]	intrauterin rendszer	PALS	tárolási időtartam
SA-laktóz [62]	vékony film	PALS	laktóz-tartalom
SA-zselatin [63]	membrán	PALS	zselatin-tartalom
Metolóz [64]	tapasz	PALS	Metolóz arány
Metolóz-PEG [65]	film	PALS, DB	PEG koncentráció
Eudragit L 30D-55 (diclofenák-Na) [66]	film	PALS	hatóanyag-tartalom
Eudragit L 30D-RL 30D-DBS [40]	film	PALS	DBS tartalom
Eudragit NE 30D [67]	film	PALS	tárolási időtartam, relatív nedvességtartalom
Kollidon K25 (teofillin) [67, 68]	tabletta	PALS	relatív nedvességtartalom
Kollidon K25 [69]	tabletta	PALS	relatív nedvességtartalom
Kollidon SR-Avicel PH101 (famotidin) [70]	tabletta	PALS	tárolási időtartam
Carbopol 71G NF-Avicel PH101 (famotidin) [70]	tabletta	PALS	tárolási időtartam
HPC [71]	film	PALS	oldószer
Kitozán [47]	hab	PALS	nedvességtartalom, kereszt-kötés-képzés
Kitozán- PVP/PEG [72]	membrán	PALS	PVP/PEG tartalom
Kitozán-glicerín/PEG [73]	film	PALS	glicerín/PEG tartalom

(DBS: dibutil-szebakát, SA: nátrium-alginát, PVP: poli-vinil-pirrolidon, HPC: hidroxipropil-cellulóz, PEG: poli-etilén-glikol)

szükséges hőmennyiséget [44]. Amennyiben a mintában szerkezeti változás következik be, az addig közel lineáris görbe (nem lineáris, mert a fajhő változik a hőmérséklettel) lefutása megváltozik, attól függően, hogy a változás exoterm vagy endoterm, csökkenésnek vagy növekedés-



nek indul. Polimerek esetében legtöbbször az üvegátalakulási hőmérsékletet (glass transition temperature, T_g) határozzuk meg DSC segítségével (12. ábra), ezt a paramétert hőmérsékletfüggő PALS-sal [28, 29, 45] vagy DB-vel is mérhetjük [46], így bizonyítható, hogy a változó mérési eredmények tényleg szerkezetváltozást jeleznek. Egyes polimer-rendszereknél a DSC-görbe nehezen kiértékelhető, ilyen esetekben a pozitronos mérés nagy segítség lehet a T_g meghatározásában, de rutinszerű alkalmazásának a DSC kb. 120-szoros (jellemző fűtési sebességek: DSC: 10K/perc, PALS: 5K/óra [28]) sebessége szab gátat.

– Képkötő eljárások.

A mikroszerkezet felderítésére, melyet a pozitronos technikákkal vizsgálunk, kézenfekvő választásnak tűnik mikroszkópot használni. Persze, hagyományos mikroszkóppal nem láthatók az anyag ilyen kis részletei, de vannak mikroszkopos technikák, melyek nagyítása már megfelelő,

hogy apró üregeit vizsgálhassuk velük. A két legfontosabb ilyen módszer az *Atomi erőmikroszkópia* (AFM, *Atomic Force Microscopy*) és a *Páztázó elektron mikroszkópia* (SEM, *scanning electron microscopy*). Az AFM a PALS-sal azonos léptékben alkot képet, a SEM-mel azonban csak a kb. 10 Å-nél nagyobb üregek láthatók [20], így egy SEM fotó-sorozatból ugyan következtethetünk a PALS mérés eredményére, de a látott és a mért változások csak összefüggésben állnak egymással, nem azonosak. Mindkét módszer (AFM, SEM) a vizsgált anyag felületéről ad képet, ellentétben a PALS-sal, amely az anyag felső, kb. 100 nm-ét méri, azonban míg az AFM háromdimenziós, addig a SEM csak 2D-s vetületet mutat. További különbség, hogy az AFM nem igényel speciális mintaelőkészítést, ahogy a PALS sem, használatához nincs szükség vákuumra. A SEM előnye ezzel szemben a sebessége, bár az AFM-nél rosszabb felbontású, de akár szinte „élőképet” képes mutatni az AFM maximális pásztázási területének (150 µm × 150 µm) többszöröséről is. Hátrányai ellenére pozitronos cikkek illusztrációjaként a SEM-fotó szolgál [47-50], míg az AFM csupán összefoglaló munkákban szerepel, rutinszerűen nem alkalmazzák.

Gyógyszerészeti alkalmazások

Mint az előző fejezetekből látható, a PALS-nak és a hozzá kapcsolódó módszereknek rendkívül szerteágazó mérési és alkalmazási lehetőségei vannak. Az alkalmazások többsége a mérnöki tudományok területéről származik, általánosan használt a módszer fémek, félvezető rendszerek, építészeti anyagok, műanyagok vizsgálatára. A gyógyszerészeti alkalmazásuk mégis igencsak szűk, alig pár laboratórium foglalkozik ilyen jellegű kutatással az egész világon, bár a módszer több, mára már rutinszerűen használt módszernél idősebb, mégis a kisműszeres mérésekhez képesti költségessége, a források beszerzéséhez, tárolásához, kezeléséhez szükséges körülmények megteremtésének nehézségei gátolják terjedését.

Ahol mégis sikerül megteremteni a megfelelő feltételeket, ott a fizikai, fizikokémiai jellemzés hasznos módszerévé válhat, segítségével ható- és segédanyagok (I. táblázat), kész gyógyszerformák (II. táblázat) vizsgálhatók. A mérési eredmények mechanikai tulajdonságokkal, kezelés, tárolás hatására bekövetkező fázis-átalakulásokkal, kioldási profilokkal való összevetése során döbbenhetünk rá, hogy az alkalmazott anyagok PALS tech-

nikával vizsgálható mikroszerkezete milyen sok mért és mérendő, gyógyszerészetileg fontos anyagi tulajdonsággal függ össze.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Új Széchenyi Terv támogatásával (TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013) valósult meg.

IRODALOM

1. Dirac, P.A.M.: Proc. R. Soc. Lond. A. 117, 610-624 (1928).
2. Dirac, P.A.M.: Proc. R. Soc. Lond. A. 118, 351-361 (1928).
3. <http://lappweb.in2p3.fr/neutrinos/aplettre.html> [2012.02.27]
4. Cowan, C.L., Reines, F., Harrison, F.B., Kruse, H.W., McGuire A.D.: Science. 20, 103-104 (1956).
5. Anderson, C. D.: Phys. Rev. 43, 491-494 (1932).
6. http://ippog-dev.web.cern.ch/sites/ippog-dev.web.cern.ch/files/import/boys_with_toys.ppt [2012.03.15.]
7. <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/fizkem/gamma/gsugar/antirez.html> [2012. 02. 27.]
8. Born, M., Oppenheimer, R.: *Quantentheorie der Molekeln. Annalen der Physik.* 84, 457-484 (1927).
9. Suzuki, N., Hirade, T., Saito, F., Hyodo, T.: Rad. Phys. Chem. 68, 647-649 (2003).
10. Sato, K., Murakami, H., Ito, K., Hirata, K., Kobayashi, Y.: Proceedings of the 37th Polish Seminar on Positron Annihilation. Acta Physica Polonica . 113, (2008)
11. Volkovitsky, P., Unterwieser, M.: Appl. Radiat. Isot. doi:10.1016/j.apradiso.2012.02.070 (Accepted Manuscript)
12. Abdul-Jabbar, N.M., Bourret-Courchesne, E.D., Wirth, B.D.: J. Cryst. Growth. doi:10.1016/j.jcrysgro.2012.02.011 (Accepted manuscript)
13. Dutta, D., Chatterjee, S., Pillai, K.T., Pujari, P.K., Ganguly, B.N.: Chem. Phys. 312, 319-324 (2005).
14. Nagasaka, B., Eguchi, T., Nakayama, H., Nakamura, N., Ito, Y.: Rad. Phys. Chem. 58, 581-585 (2000).
15. Calloo, J., Jaeger, H.: American Physical Society, Meeting of the APS Ohio Section and AAPT Appalachian and Southern Ohio Sections, 2010
16. Campbell, J. L., Schulte, C.W., Dieterly, D.K.: Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process. 6, 327-334 (1975).
17. Kögel, G., SPM-Group: Appl. Surf. Sci. 116, 108-113 (1997).
18. Manuel, O.: Origin of elements in the solar system: implications of post-1957 observations. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
19. Hashimoto, T., Nakai, K., Wakasaya, Y., Tanihata, I., Fulop, Z., Kumagai, H., Ozawa, A., Yoshida, K., Goswami, R.: Nucl. Phys. A. 686, 591-599 (2001).
20. Jean, Y.C., Mallon, P.E., Schrader, D.M. (editors): Principles and Applications of Positron and Positronium Chemistry. World Scientific, Singapore, 2003.
21. Mincov, I., Petkov, M.P., Tsou, P., Troev, T.: J. Non-Cryst. Solids. 350, 253-258 (2004).
22. Paranhos, C.M., Soares, B.G., Machado, J.C., Windmüller, D., Pessan, L.A.: Eur. Polym. J. 43, 4882-4890 (2007).
23. Djourelou, N., Ateş, Z., Güven, O., Misheva, M., Suzuki, T.: Polymer. 48, 2692-2699 (2007).
24. Danch, A., Osoba, W.: Rad. Phys. Chem. 68, 445-447 (2003).
25. Sato, K., Murakami, H., Ito, K., Hirata, K., Kobayashi, Y.: Rad. Phys. Chem. 78, 1085-1087 (2009).
26. Butterling, M., Anwand, W., Cowan, T.E., Hartmann, A.,

- Jungmann, M., Krause-Rehberg, R., Krille, A., Wagner, A.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B. 269, 2623–2629 (2011).
27. Suzuki, T., Ito, Y., Kondo, K., Hamada, E., Ito, Y.: Rad. Phys. Chem. 58, 485–489 (2000).
 28. Kim, S.H., Chung, J.W., Kang, T.J., Kwak, S.-Y., Suzuki, T.: Polymer. 48, 4271–4277 (2007).
 29. Mohamed, H.F.M., El-Sayed, A.M.A., Abd-Eladek, G.G.: Polym. Degrad. Stab. 71, 93–97 (2001).
 30. Fujinami, M., Sawada, T., Akahane, T.: Rad. Phys. Chem. 68, 631–634 (2003).
 31. Zhang, J.D., Zhou, T.J., Cheung, C.K., Beling, C.D., Fung, S., Ng, M.K.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A. 560, 552–557 (2006).
 32. Siegle, A., Stoll, H., Castellaz, P., Major, J., Schneider, H., Seeger, A.: Appl. Surf. Sci. 116, 140–144 (1997).
 33. http://positron.physik.uni-halle.de/EPOS/pdf/Stoll_AMOC_talk_EPOS02.pdf [2012.03.10.]
 34. Korhonen, T.; Puska, M. J.; Nieminen, R. M.: Phys. Rev. B: Condens. Matter. 54, 15016–15024 (1996).
 35. Staab, T.E.M., Krause-Rehberg, R., Kieback, B.: J. Mat. Sci. 34, 3833–3851 (1999).
 36. Kawaguchi, Y., Shirai, Y.: J. Nucl. Sci. Technol. 39, 1033–1040 (2002).
 37. de Vries, J.: Positron lifetime technique with applications in material science. Delftse Universitaire Pers, 1987.
 38. Nilen, R.W.N., Lauff, U., Connell, S.H., Stoll, H., Siegle, A., Schneider, H., Castellaz, P., Kraft, J., Bharuth-Ram, K., Sellschop, J.P.F., Seeger, A.: Appl. Surf. Sci. 116, 198–202 (1997).
 39. Shantarovich, V.P., Suzuki, T., He, C., Davankov, V.A., Pastukhov, A.V., Tsyurupa, M.P., Kondo, K., Ito, Y.: Macromolecules. 35, 9723–9729 (2002).
 40. Zelkó, R., Orbán, A., Süvegh, K., Riedl, Z., Rácz, I.: Int. J. Pharm. 244, 81–86 (2002).
 41. Mohamed, H.F.M., El-Aziz, N.S.A.: Polymer. 42, 8013–8017 (2001).
 42. Nakanishi, H., Wang, S.J., Jean, Y.C.: Microscopic surface tension studied by positron annihilation. In: Sharma, S.C. (ed.): Positron Annihilation Studies of Fluids. World Scientific, Singapore, 1988. pp. 292.
 43. Lowell, S.: Introduction to Powder Surface Area, Wiley, New York, 1979.
 44. U.S. Patent 3,263,484 (1962)
 45. Dlubek, G., Shaikh, M.Q., Ratzke, K., Pionteck, J., Paluch, M., Faupel, F.: Eur. J. Pharm. Sci. 41, 388–398 (2010).
 46. Zhang, J., Zhang, R., Chen, H., Li, Y., Wu, Y.C., Suzuki, R., Sandreckski, T.C., Ohdaira, T., Jean, Y.C.: Rad. Phys. Chem. 68, 535–539 (2003).
 47. Chaudhary, D., Went, M.R., Nakagawa, K., Buckman, S.J., Sullivan, J.P.: Mater. Lett. 64, 2635–2637 (2010).
 48. Sharma, S.C., Dark, C.A., Hyer, R.C., Green, M., Black, T.D., Chourasia, A.R., Chopra, D.R., Mishra, K.K.: Appl. Phys. Lett. 56, 1781–1783 (1990).
 49. Wästlund, C., Berndtsson, H., Maurer, F.H.J.: Macromolecules. 31, 3322–3327 (1998).
 50. Chakrabarti, K., Nambissan, P.M.G., Mukherjee, C.D., Bardhan, K.K., Kim, C., Yang, K.S.: Carbon. 44, 948–953 (2006).
 51. Zelkó, R., Süvegh, K.: Eur. J. Pharm. Sci. 21, 519–523 (2004).
 52. Kiss, D., Süvegh, K., Marek, T., Dévényi, L., Novák, Cs., Zelkó, R.: AAPS Pharm. Sci. Tech. 7, 95 (2006).
 53. Szabó, B., Süvegh, K., Zelkó, R.: Int. J. Pharm. 416, 160–163 (2011).
 54. Kilburn, D., Claude, J., Schweizer, T., Alam, A., Ubbink, J.: Biomacromolecules. 6, 864–879 (2005).
 55. Li, Y., Zhang, R., Chen, H., Zhang, J., Suzuki, R., Ohdaira, T., Feldstein, M.M., Jean, Y.C.: Biomacromolecules. 4, 1856–1864 (2003).
 56. Cowie, J.M.G., McEwan, I., McEwen, I.J., Pethrick, R.A.: Macromolecules. 34, 7071–7075 (2001).
 57. Abdel-Hady, E.E., El-Sayed, A.M.A.: Polym. Degrad. Stab. 47, 369–373 (1995).
 58. Lobo, B., Ranganath, M.R., Ravi Chandran, T.S.G., Venugopal Rao, G., Ravindrachary, V., Gopal, S.: Phys. Rev. B. 59, 13693–13698 (1999).
 59. Paranhos, C.M., Soares, B.G., Oliveira, R.N., Pessan, L.A., de Freitas, D.S., Windmüller, D., Machado, J.C.: J. Appl. Pol. Sci. 105, 899–902 (2007).
 60. Sharma, S.K., Roudaut, G., Fabing, I., Duplâtre, G.: Phys. Chem. Chem. Phys. 12, 14278–14284 (2010).
 61. Patai, K., Szente, V., Süvegh, K., Zelkó, R.: J. Pharm. Biomed. Anal. 53, 902–905 (2010).
 62. Bajdik, J., Makai, Zs., Berkesi, O., Süvegh, K., Marek, T., Erős, I., Pintye-Hódi, K.: Carbohydr. Polym. 77, 530–535 (2009).
 63. Li, Y., Jia, H., Cheng, Q., Pan, F., Jiang, Z.: J. Membr. Sci. 375, 304–312 (2011).
 64. Papp, J., Szente, V., Süvegh, K., Zelkó, R.: J. Pharm. Biomed. Anal. 51, 244–247 (2010).
 65. Pintye-Hódi, K., Regdon Jr., G., Erős, I., Süvegh, K., Marek, T., Kéry, I., Zelkó, R.: Int. J. Pharm. 313, 66–71 (2006).
 66. Bölskei, É., Süvegh, K., Marek, T., Regdon Jr., G., Pintye-Hódi, K.: Rad. Phys. Chem. 80, 799–802 (2011).
 67. Zelkó, R., Orbán, A., Süvegh, K.: J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 249–254 (2006).
 68. Zelkó, R., Süvegh, K.: Eur. J. Pharm. Sci. 24, 351–354 (2005).
 69. Süvegh, K., Zelkó, R.: Macromolecules 35, 795–800 (2002).
 70. Szente, V., Süvegh, K., Marek, T., Zelkó, R.: J. Pharm. Biomed. Anal. 49, 711–714 (2009).
 71. Bajdik, J., Regdon Jr., G., Marek, T., Erős, I., Süvegh, K., Pintye-Hódi, K.: Int. J. Pharm. 301, 192–198 (2005).
 72. Minfeng, Z., Xudong, S., Yun, W., Xiandong, Y., Huiquan, X., Baoyi, W., Chenze, Q.: Rad. Phys. Chem. 77, 1062–1068 (2008).
 73. Bajdik, J., Marciello, M., Caramella, C., Domján, A., Süvegh, K., Marek, T., Pintye-Hódi, K.: J. Pharm. Biomed. Anal. 49, 655–659 (2009).

Krónikus obstruktív tüdőbetegség kezelése inhalációs farmakoterápiával: a kortikoszteroidok szerepe

KARDOS ZSUZSANNA

Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Budapest, Pihenő út 1. – 1121
Levelezési cím: zsuzsanna.kardos2011@gmail.com

Summary

Kardos, Z.: *Treatment of chronic obstructive pulmonary disease with inhaled pharmacotherapy: role of corticosteroids*

Cigarette smoke-induced airway inflammation plays a central role in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). It causes bronchial epithelial cell injury, which in turn initiates the recruitment of inflammatory cells and increases the production of cytokines, chemokines, proteases and other pro-inflammatory mediators followed by oxidative stress and protease/anti-protease imbalance impairing lung parenchymal elastic structures. Inhaled corticosteroids in combination with long-acting bronchodilators are generally recommended for the treatment of COPD. However, steroid responsiveness of patients with COPD is often poor, since oxidative stress may reduce the activity and expression of histone deacetylases, and therefore interfere with the anti-inflammatory action of corticosteroids. Recently, a number of studies has indicated that presence of sputum eosinophilia and/or elevated exhaled nitric oxide (NO) level may predict a better response to corticosteroid treatment in COPD patients. While sputum processing and its profiling is a time-consuming and technically demanding method, exhaled NO measurement is a simple and completely non-invasive tool, thus, the later could be more convenient for routine clinical use in the future.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, corticosteroids, nitrogen oxide, oxidative stress, steroid responsiveness

Összefoglalás

A cigarettafüst által okozott légúti gyulladás központi szerepet játszik a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) patofiziológiájában. Hatására a bronchialis epithelsejtek károsodnak és a gyulladásos sejtek aktiválódása különböző citokinek, kemokinek, proteázok és pro-inflammatorikus mediátorok felszabadulásához vezet, majd a kialakuló oxidatív stressz hatására a proteáz/antiproteáz egyensúly megbomlik, ami végül a tüdő parenchyma elasztikus struktúráinak pusztulásához vezet. Napjainkban a COPD-s betegek gyógyszeres kezelése az inhalációs kortikoszteroidok és az elhúzódo hatású hörgőtágítók együttes adásával történik. A betegek szteroidérzékenysége azonban sok esetben igen csekély, mivel az oxidatív stressz a hiszton deacetiláz enzim gátlásán keresztül csökkenti a szteroidok gyulladáscsökkentő hatását. Az utóbbi évek kutatási eredményei szerint csak azon betegeknél várható számottevő javulás, akiknek a köpetében az eosinophilejtszám, illetve akik által kilélegzett levegő nitrogén-monoxid (NO) koncentrációja magasabb. Amíg az eosinophilejtszám meghatározása meglehetősen munka- és időigényes feladat, addig a kilélegzett NO mérés egy egyszerű, non-invazív módszer, amely a jövőben a rutin klinikai gyakorlatban is teret nyerhet.

Kulcsszavak: kortikoszteroidok, krónikus obstruktív tüdőbetegség, nitrogén-monoxid, oxidatív stressz, szteroidérzékenység

Bevezetés

A krónikus obstruktív tüdőbetegséget (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) idült légúti gyulladás, nagyrészt irreverzibilis légúti obstrukció, progresszív kórlefordulás és változó mértékű extrapulmonalis tünetek megjelenése jellemezi. A tüdőszövet pusztulásával járó légúti obstrukció többnyire a dohányfüst belégzését kísérő kóros gyulladásos reakció következménye [1].

A COPD korunk egyik népbetegsége, az epidemiológiai adatok szerint a föld felnőtt lakosságának 5-13%-át érinti és a betegek száma évről-évre meredeken emelkedik [2]. Hazánkban pontos epidemiológiai adatok nincsenek, de a becsült betegek száma 400-500 ezer lehet. A COPD jelentős

mortalitási és morbiditási tényező, jelenleg a 45 évnél idősebbek között a 4. vezető halálok, de az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése szerint 2020-ra a 3. leggyakoribb halálokká válik a világon, ha a levegő szennyezettsége és a dohányzók száma nem csökken [3]. A COPD az egészségügyi kiadások szempontjából is meghatározó kórkép, elsősorban az akut exacerbációk (fellángolások) kórházi kezelése igen költséges [4]. A hazai adatok szerint a pulmonológiai fekvőbeteg ellátásban a COPD részesedése kb. 21% [5].

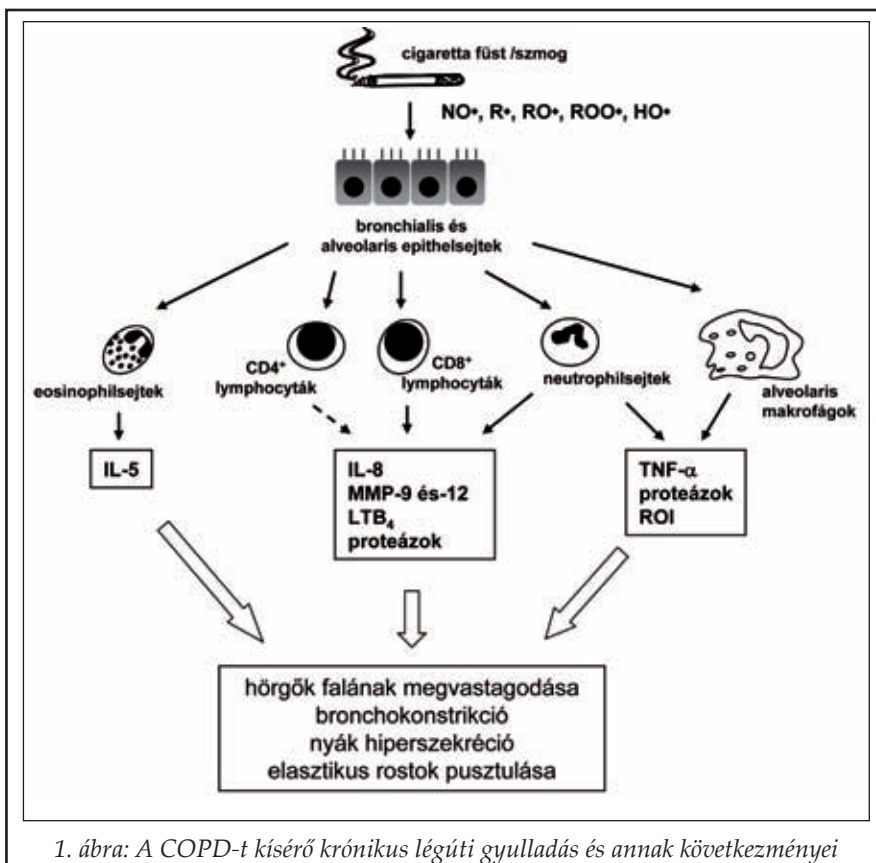
Hosszú időn keresztül csak a dohányzás elhagyásával tudták az ilyen betegek progresszív funkcióvesztését némileg mérsékelni [6], de napjainkban – különösen a betegség korai stádiumában – az inhalációs hörgőtágítók és a kortikoszteroidok

együttes adagolásával már számottevő javulás érhető el [7, 8]. Hatásukra a légúti gyulladás fokozatosan csökken és számos betegségmutató (légzésfunkciós romlás üteme, exacerbációs gyakoriság, életminőség, mortalitás stb.) kedvezően változik meg. Közismert azonban, hogy a COPD-s betegek szteroidérzékenysége nagyon eltérő, sőt a betegek egy része „szteroidrezisztens” [9], ezért a hatékony gyógyszeres kezelés nem nélkülözheti a beteg szteroidérzékenységének a pontos ismeretét. Az utóbbi években vált ismertté az is, hogy a szteroidkezelés hatékonysága és a köpetben lévő eosinophilesejtek száma között szoros összefüggés van, azaz az ún. *köpet eosinophilia* jelzi a légzésfunkció (FEV₁, [ml]: erőltetett kilégzési másodperctérfogat) javulásának mértékét [10, 11]. Minthogy a betegek köpetében lévő eosinophilesejtek száma és a kilégzett levegő nitrogén-monoxid (NO) koncentrációja közötti összefüggés lineáris, a *köpet eosinophilia* non-invazív módon, a kilégzett levegő NO koncentrációjának mérésével is meghatározható [12].

Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül ezért röviden összefoglalom a COPD-re jellemző légúti gyulladás és az ezzel összefüggő szteroidrezisztencia farmakológiai vonatkozásait, valamint a szteroidérzékenység meghatározásának a klinikai gyakorlatban alkalmazott módszereit.

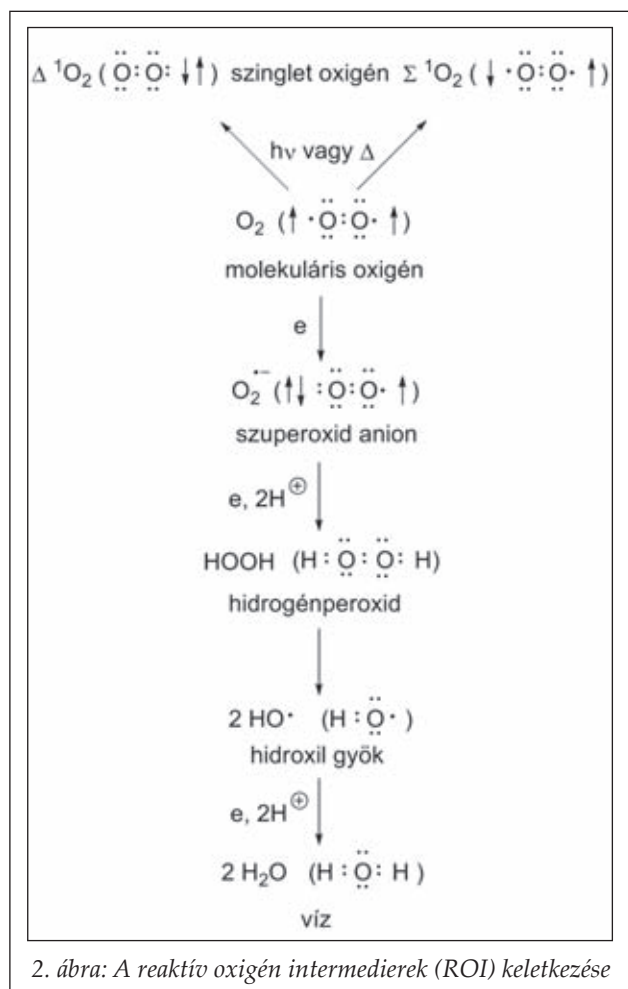
Légúti gyulladás COPD-ben

A COPD-t kísérő krónikus légúti gyulladást makrofágok, neutrophilesejtek, helper és citotoxikus T-sejtek, valamint az eosinophilesejtek jelenléte jellemzi, és a gyulladással sejtinfiltráció kimutatható nemcsak a légutakban, hanem a kötőszövetekben és a pulmonalis érhalózatban is. A gyulladás kialakulásában és a fenntartásában is elsősorban a szmog toxikus gáznemű anyagainak rendszeres belélegezése és fokozott mértékben a dohányfüst expozíciója játszik meghatározó szerepet (1. ábra). Ezek toxikus anyagai a tüdőbe jutva a bronchialis és alveolaris epithelsejteket károsítják,



melynek során a nem-specifikus (makrofágok és neutrophilesejtek) és az adaptív (CD4⁺ lymphocyták) immunsejtek aktiválódnak. A dohányzó COPD-s betegekben az adaptív immunválasz kifejezett aktiválódását a lymphocytá folliculusok megjelenése mutatja [13]. A folliculusokból izolált B-lymphocyták indukcióját mikrobiális és dohányfüst antigének, illetve az epithelsejtek és egyéb mesenchymalis struktúrák ellen termelődő auto-antitestek okozzák [14]. Az indukció több ponton is hasonlóságot mutat a szervkilökődéseknél tapasztalt immunválasszal [15, 16].

Az aktivált gyulladással sejtekből különböző citokinek, mediátorok és szöveti károsodást okozó ágensek, mint például proteázok, oxidánsok és toxikus peptidek szabadulnak fel [17]. Ilyenek a neutrophil kemotaktikus faktorok közé sorolható leukotrién (LTB₄) és az interleukin (IL)-8; vagy az alveolaris makrofágokból felszabaduló tumor nekrosis faktor (TNF)-α, amely a szöveti destrukció központi mediátora. A legfontosabb proteázok közé a mátrix metalloproteáz (MMP)-9 és -12 sorolható. A szöveti hipoxaemia hatására ATP [18] és egyéb vazóaktív anyagok, így például angiotenzin II is termelődnek. A közelmúltban mutatták ki, hogy az utóbbinak vazokonstriktor hatása mellett növekedési faktor-szerű és gyulladásszabályozó



hatása is van [19, 20]. A transforming growth factor (TGF)- β – hasonlóan más szövetekben mutatott hatásához –, a sejtek proliferációjának szabályozásában vesz részt, és a tüdő fibroblastok extracelluláris mátrixtermelésének legfontosabb induktora [21]. 2009-ben azt is valószínűsítették, hogy az IL-5 fontos mediátor a köpet eosinophiliát mutató COPD-s betegek alcsoportjában [22]. A bronchiolitis obliterans kialakulásában szerepet játszó vascular endothelial growth factor (VEGF) [23], mint angiogén mediátor a COPD-ben szenvedő betegek pulmonális érrendszerének remodeling folyamataiban tölt be fontos szerepet [24]. Végül megemlítendő, hogy a citokin mintázatok elemzése a COPD-vel együtt járó társbetegségek felismerésében napjainkban is intenzíven vizsgált terület [25, 26].

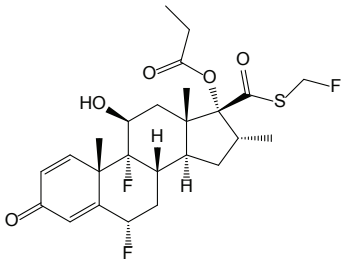
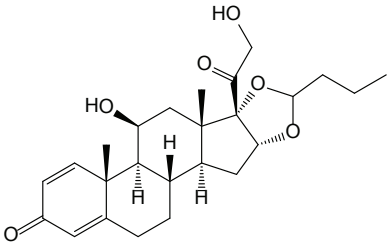
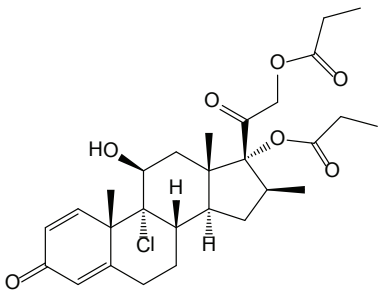
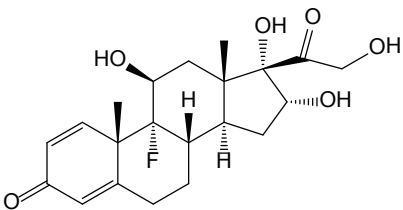
A betegség progressziója a tüdőszövet átalakulásához vezet, amely az 1. ábrán feltüntetett négy jellegzetes folyamatból áll [27]: (I) a hörgők fala megvastagodik, (II) a simaizomsejtek tónusa jelentősen megnő (bronchokonstriktió), (III) a nyák kiválasztása fokozódik és végül (IV) az elasztikus rostok elpusztulnak.

E morfológiai elváltozások hátterében két alapvető patomechanizmus, az oxidatív stressz és a szöveti proteáz/antiproteáz egyensúly megbomlása áll [17]. Mint ismeretes az oxidatív stressz a légzéssel kapcsolatos, melynek során a tüdőnkben felvett molekuláris oxigén (O_2) a sejteinkbe kerülve az ún. biológiai oxidációban hasznosul. E molekula szerkezetét tekintve ún. kettős gyök, mivel az oxigén atomokon azonos spinnel (\uparrow) egy-egy elektron található (2. ábra). A molekuláris oxigén ezért gyenge oxidálószer és meglehetősen lomhán reagál 36 °C-on szerves molekulákkal. Fény vagy hő hatására azonban könnyen az ún. delta (Δ) vagy a szigma (Σ) állapotú szinglet oxigén molekulává alakul át, melyek közül az előbbiben az imént említett két elektron spin kompenzációval ($\uparrow\downarrow$) azonos pályán, míg a szigma állapotban e két elektron hasonló módon, de eltérő energiájú pályán található. Ez utóbbi, így nemcsak megőrizte a gyök tulajdonságát, hanem reaktívabbá is vált (reaktív oxigén intermedierek, ROI), és már készségesen reagál szerves molekulákkal vagy egyelektronos redukcióval könnyen az ún. szuperoxid anionná (O_2^-) alakul át. Ebből hidrogénnel reagálva két lépésben ($\text{O}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOO} + \text{H} \rightarrow \text{HOOH}$) hidrogénperoxid keletkezik, amely az oxigénjei közötti kötés homolitikus hasadásával a rendkívül reaktív hidroxilgyökké ($\text{HO}\cdot$) alakul át. Ez a ROI szerves molekulákkal már nagyon könnyen reagál és gyökként ($\text{H}\cdot$) hidrogént lehasítva víz keletkezése közben stabilizálódik [28]. Fiziológiai körülmények között a molekuláris oxigén a citochrom-P450b, szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz (CAT) és glutation peroxidáz (GSH) enzimek által katalizált folyamatban redukálódik vízzé.

Az oxigénből keletkező ROI-k fontos szerepet játszanak szervezetünk biomolekuláinak szintézisében is. Ezt a 3. ábrán az arachidonsav (AA) metabolizmusa szemlélteti. Mint ismeretes, a véredényrendszer epitelsejtjeinek foszfolipid membránjában a ROI-k által kiváltott lipidperoxidáció (LPO) jelentősen fokozza a foszfolipáz A_2 enzim aktivitását, és így arachidonsav (AA) szabadul fel. E vegyület, a ciklooxigenáz enzim katalizált sztereo- és regiospecifikus addíciót követően, Σ -szinglet oxigénnel ($\downarrow^1\text{O}_2\uparrow$) és hidroperoxidgyökkel ($\cdot\text{OOH}$) készségesen reagál, és cikloendoperoxid (PGG_2) keletkezik, amely hidroxilgyököt veszítve a simaizmok kontrakcióját, a gyomorsav szekrécióját és a méh összehúzódását befolyásoló prosztaglandinok (PG), valamint az erek és a légcső kontrakcióját kiváltó tromboxánok szintézisének közös intermediérévé, a PGH_2 -vé alakul át. Az AA-ból lipoxigenáz enzim által katalizált úton pedig a gyulla-

1. táblázat

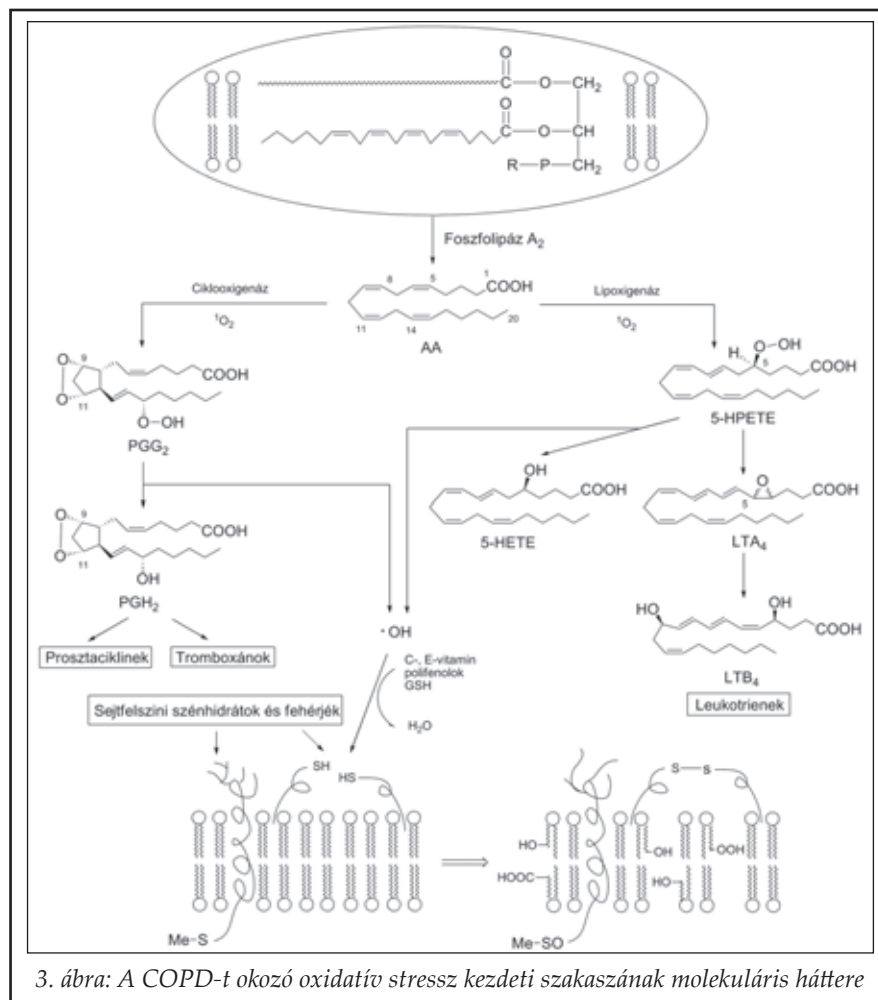
A COPD kezelésében használt inhalációs kortikoszteroidok hatóanyaga, alkalmazási formája és kémiai szerkezete

Hatóanyag	Beviteli forma	Kémiai szerkezet
Fluticason propionát	adagoló belégző (MDI és DPI)	
Budesonid	adagoló belégző (DPI) inhalációs oldat	
Beclomethason	adagoló belégző (MDI és DPI) inhalációs oldat	
Triamcinolon	adagoló belégző (MDI)	

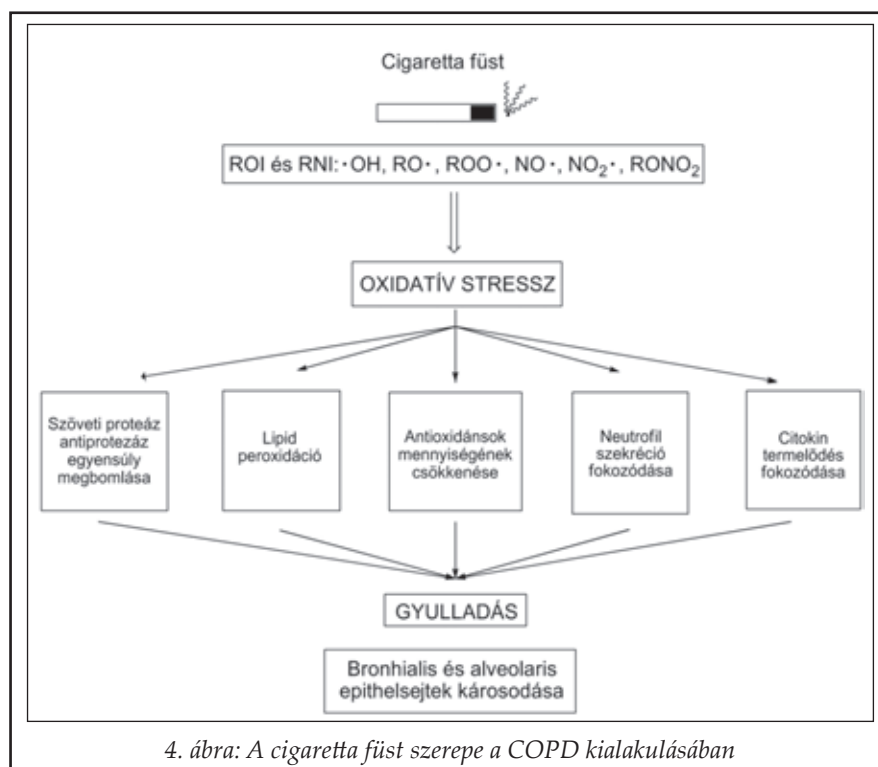
MDI: metered dose inhaler (meghatározott dózist adagoló belégző); DPI: dry powder inhaler (száraz por belégző)

dás szignálanyagainak az ún. leukotrieneknek (pl. LTB_4 és 5-HETE) előanyaga, az 5-hidroperoxi-eikozatetraénsav (5-HPETE) keletkezik. A PGH_2 és 5-HPETE matabolizmusa során hidroxilgyök keletkezik, melyet vízzé redukálva – az egészséges szervezetben – az antioxidáns molekulák (C- és E-vitamin, polifenolok és GSH enzim) közömbösítik [29]. Ha azonban a szervezet antioxidáns kapacitása kimerül, akkor ROI-k koncentrációja jelentősen megnő, és ezáltal a sejtek membránjában folyó LPO felgyorsul (oxidatív stressz), a sejtmembrán jelentősen károsodik és végül különféle kórképek (pl. gyulladás, szív- és érrendszeri károsodás, légúti obstrukció, cukorbetegség, Parkinson-kór) alakulnak ki.

A dohány pirolízisekor a reaktív oxigén intermedierek mellett számos reaktív nitrogén intermedier (RNI: NO, NO_2 , HONO, RONO stb.) is keletkezik [30], amelyek számottevően fokozzák az alveoláris makrofágok és a neutrophil granulocyták ROI termelését [17]. Az így fokozódó oxidatív stressz hatására a szervezet antioxidáns kapacitása (a fent említettek mellett még a hem oxigenáz [HO], a nitrogén-monoxid szintáz [NOS] és a glutation-S-transzferáz [GST]) kimerül, a szöveti proteáz-antiproteáz egyensúly megbomlik, a LPO felgyorsul, ami a neutrofil szekréció és a citokininek termelésének fokozódásához, végül krónikus gyulladásához vezet, melyben a bronchiális és alveoláris epithelsejtek súlyosan károsodnak (4. ábra).



3. ábra: A COPD-t okozó oxidatív stressz kezdeti szakaszának molekuláris háttere



4. ábra: A cigaretta füst szerepe a COPD kialakulásában

Légúti gyulladás és légutak savasodásának kapcsolata

A közelmúltban amerikai kutatók közölték, hogy a COPD-s betegeknél a kilégzett levegőpára kondenzátuma savasabb (pH= 6.2-6.8), mint az egészségeseké. Ebből a légutakat borító folyadékfilm, az ún. airway surface liquid (ASL) hasonló változására következtettek [31]. A savasodás nemcsak az inhalációs gyógyszerek tüdőből való felszívódását befolyásolja, hanem kórélettani szempontból is fontos lehet. A savasodás patofiziológiai következményei feltehetően a fokozott bronchokonstriktió [32] és a csökkent ciliáris (csillószerű) működés is [33]. Jóllehet a kilégzett levegőpára non-invazív módon az 5. ábrán látható műszerrel könnyen gyűjthető és pH-ja – reprodukálhatóan – kellő pontossággal meghatározható, az egészséges személyektől vett levegő minták vizsgálata mégis azt mutatta, hogy a pH egyénenként is számottevően ingadozik [34, 35], ezért érthető, hogy a COPD-s betegek körében nyert adatok meglehetősen ellentmondásosak [36, 37, 38]. Az eltérő eredmények háttérében feltehetően méréstechnikai különbségek [39], a dohányzás zavaró hatása [38], a kondenzátum gyűjtésére használt eszközök különbözősége [40] vagy más környezeti vagy mintagyűjtéssel kapcsolatos tényezők [41, 42] állnak. Más tüdőbetegségekben, így például az asztmában [38], a daganatos tüdőbetegségekben [43] vagy a tüdőtranszplantációt követő kilökődési reakciókban [44, 45] is megfigyelték, hogy a kilégzett levegő pH-ja megváltozik, melynek kórélettani okainak pontosabb megismerésére napjainkban is élénk kutatások folynak.

Szteroidrezisztencia kialakulása COPD-ben

Az inhalációs kortikoszteroidokat (1. táblázat) széles körben alkalmazzák az obstruktív tüdőbetegségek, így a COPD kezelésében is. Napjainkban azonban ezeket leggyakrabban hosszú-hatású antikolinerg (pl. tiotropium) és β_2 -agonista hörgőtágítókkal (pl. formoterol, salmeterol) kombinált formában adják. Minthogy a COPD típusú légúti gyulladásban szenvedő betegek többségének a szteroidérzékenysége igen csekély, így a betegeknek csak egy kisebb alcsoportjában várható és érhető el számottevő légzésfunkciós javulás [46]. Talán nem érdektelen megjegyezni, hogy az asztmás betegek nagy része ugyanakkor jó válaszkésztséget mutat kortikoszteroidokra, és a valódi szteroidrezisztens asztma igen ritka.

Jól ismert, hogy a kortikoszteroidok – a szteroid hormonokhoz hasonlóan –, szabadon diffundálnak a sejtmembránon keresztül a citoplazmába és ott specifikus receptorokhoz kötődnek. Ezt követően a ligand-receptor komplexek a sejtmagba transzlokálódnak és ott alakul ki a kortikoszteroidok klasszikus gén-specifikus hatása.

A kortikoszteroidok a foszfolipáz A_2 enzim aktivitásának gátlása mellett (3. ábra) számos pro-inflammatorikus gén represszióját is okozzák, és a jelentős gyulladáscsökkentő hatásuk főként ennek köszönhető [9]. A gének expresszióját (kifejeződését) számos tényező, többek között a core hisztonok enzimatisz módosítása is befolyásolja. Így például a core hisztonok *N*-terminális régiójának poszt-transzlációs módosulása (acetilálás, metilálás, foszforiláció, stb.) fontos génregulációs folyamat [47]. A hiszton-acetiltranszferáz (HAT) aktivitású koaktivátorok hozzájárulnak egyes pro-inflammatorikus gének expressziójának fokozódásához, míg a hiszton-deacetiláz (HDAC) hatású korepresszorok csökkentik a pro-inflammatorikus génszakaszokon a kifejeződés mértékét.

Angol kutatók elsőként ismerték fel, hogy a COPD-s betegekben az oxidatív stressz fokozódása az acetiláz/deacetiláz rendszer diszfunkciójához vezetett, amely némileg magyarázatot adott a szteroidok viszonylagos hatásgyengességének okaira a COPD kezelést illetően [48]. Egészséges szervezetben

a kortikoszteroidok ugyanis a receptoraikhoz kapcsolódva növelik a HDAC2 enzim expresszióját, amely a hisztonok acetilezésének visszaszorításán keresztül csökkenti a pro-inflammatorikus citokinek termelődését a sejtekben. A COPD-s betegekben a cigarettafüst hatására az NF- κ B transzkripció faktor indukcióján keresztül a pro-inflammatorikus citokinek expressziója fokozódik. Az oxidatív stressz során azonban peroxinitrit képződik, amely az HDAC2 enzimsaládot inaktíválja, és így az egyensúly a hisztonok acetilálása felé tolódik el. Ezáltal a kortikoszteroidok gyulladáscsökkentő hatásukat nem vagy csak korlátozott mértékben képesek kifejteni (6. ábra).

Szteroidérzékenység meghatározása: klinikai lehetőségek

Ha a COPD-ben szenvedő betegek köpetében az eosinophilsejtek száma megemelkedik ($>3\%$), akkor ún. *köpet eosinophiliáról* beszélünk. Az ezredfordulón angol és olasz kutatók figyelték meg, hogy a köpet eosinophiliát mutató COPD-s betegeknek a rövid ideig tartó szisztémás [10, 11] vagy inhalációs [49] kortikoszteroid kezelés hatására a betegségmutatók közül a FEV_1 esetében a növekedés szignifikánsan nagyobb, mint a köpet eosinophiliát nem mutató betegcsoportban, ezért jelenleg a köpet eosinophiliát tekintik a szteroidérzékenység markerének COPD-ben. A köpet feldolgozása azonban meglehetősen idő- és munkaigényes feladat, melyhez nemcsak megfelelően felszerelt laboratórium, hanem a köpet sejtés fázisának kiértékeléséhez szakmailag alaposan felkészült asszisztens is kell. E módszernek a bevezetésére a kórházainkban a közeljövőben, bizonyára nem, vagy csak igen korlátozott módon lesz lehetőség.

A betegek szteroidérzékenysége a kilélegezett levegő NO szintjének non-invazív mérésével jóval egyszerűbben is meghatározható [50]. Az NO koncentrációjának mérése a légzésfunkciós méréshez hasonlóan egy kilégzési manőver során történik. A vizsgált személy belégzést követően egy adott ellenállással szemben, állandó kilégzési áramlási sebességgel fújja át a levegőt az NO mérést végző műszer szájrésebe, és a kívánt adat a



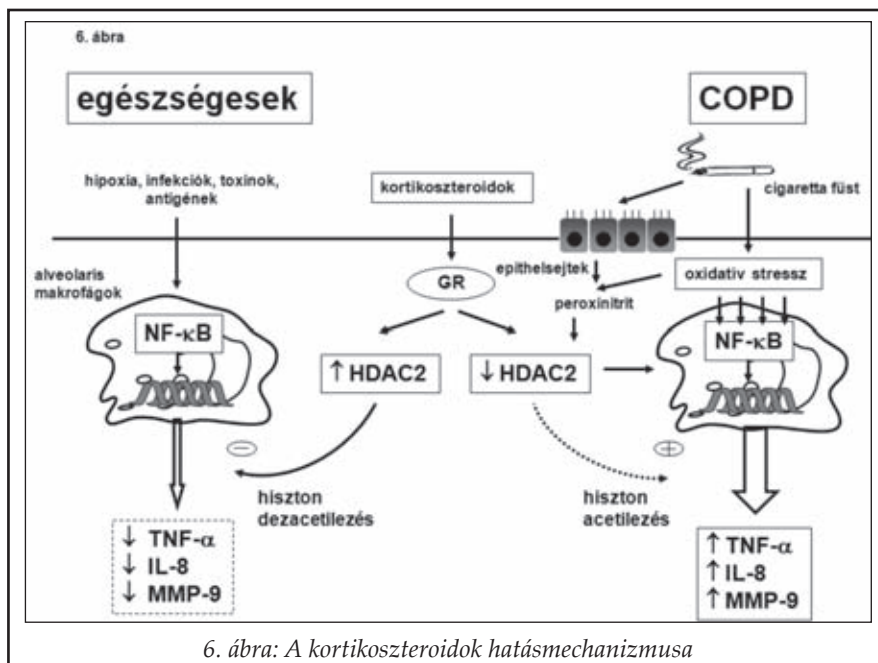
5. ábra: A kilélegezett levegőpára (kondenzátum) gyűjtésére használatos ún. EcoScreen típusú készülék

műszer kijelzőjén néhány másodperc múlva olvasható.

A kereskedelmi forgalomban számos laboratóriumi NO mérőműszer kapható, sőt a közelmúltban már kisméretű, hordozható készülékek hazánkban is hozzáférhetővé váltak. Az utóbbiak beszerzése sem jelent túlságosan nagy beruházást (kb. 1 Mft), és a használatuk pedig egyáltalán nem igényel laboratóriumi háttérrel és komolyabb képzettségű aszisztenciát. A széleskörű vizsgálatok azt mutatták, hogy a kézi készülékekkel kapott eredmények jól korreláltak a validált, nagyérzékenységű laboratóriumi készülékeken mértékekkel [51, 52].

A kilégzett NO mérés az eosinophilejt dominanciával járó (asztmás típusú) légúti gyulladás felismerésében és monitorozásában használható fel leginkább [53], bár más kórképekben, így például tüdőtranszplantált betegek pulmonalis szövődmenyeinek felismerésében is értékes kiegészítő vizsgálat lehet [54, 55].

Az ezredfordulón vált ismertté, hogy a rövidhatású β_2 -receptor agonistákra részleges funkcionális reverzibilitást mutató COPD-s betegeknek mind a köpet eosinophilejtszám, mind pedig a kilégzett NO szint magasabb a reverzibilitást nem mutató betegekéhez képest [56]. A magasabb NO szint és jobb funkcionális válaszkészség kapcsolata később akut exacerbáció miatt hospitalizált betegekben is igazolták [57]. Emellett több kutatócsoport talált szignifikáns korrelációt a betegek ún. „alapvonalis NO szintje” és rövid ideig tartó inhalációs kortikoszteroid kúra után észlelhető FEV₁ növekedés mértéke között [58, 59]. Két másik, közelmúltban végzett vizsgálatban is a kilégzett NO-t jó prediktív értékű biomarkernek találták a rövid ideig tartó, szisztémás [60] vagy inhalációs [61] szteroid kezelés után észlelt FEV₁ növekedés szempontjából. Jóllehet a magas NO szint (>50 ppb) csak korlátozott mértékben utalt a kedvező szteroid válaszra (pozitív prediktív érték: 67%), az alacsony NO szintnek (<25 ppb) magas negatív prediktív értéke (87%) volt, amely így az a szteroid válasz hiányát vetítette előre nagy biztonsággal [61]. E vizsgálatok arra utalnak, hogy a kilégzett NO koncentrációjának egyszerű, non-



invasív méréséből a COPD-s betegek szteroid-érzékenysége viszonylag nagy biztonsággal megjósolható.

Inhalációs farmakoterápia jelentősége COPD-ben

Az elmúlt évtizedekben a COPD-t jellemző progresszív légúti funkcióvesztés (Δ FEV₁/év) csökkentése számos klinikai vizsgálatnak volt az alapvető célkitűzése. Tekintettel arra, hogy a FEV₁ mérés variabilitása még egészséges személyek között is igen nagy, a terápiás hatás igazolásához több ezer betegnek legalább 3-4 éven át tartó rendszeres megfigyelése szükséges. Ezek az elvárások teljesültek két, napjainkban mérföldkőnek számító klinikai vizsgálatban, a „Toward a Revolution in COPD Health” (TORCH) és az „Understanding Potential Long-term Impacts on Function with Tiotropium” (UPLIFT) vizsgálatokban [62]. E vizsgálatokban az elsődleges és másodlagos adatelemzések során egyértelműen igazolódott, hogy inhalációs kortikoszteroidok és elhúzódo hatású hörgőtágítók együttes alkalmazása mellett az évi FEV₁ csökkenés üteme – ha szerény mértékben is – de lassul [63, 64]. Emellett megerősítést nyert, hogy e gyógyszerek jelentős mértékben csökkentik a COPD akut exacerbációinak számát és kórházi felvételek gyakoriságát is, melyek kedvezően befolyásolják a betegek életminőségét. Valószínű, hogy a kedvező hatások háttérében a kortikoszteroidok és a hörgőtágítók egymást erősítő hatása áll. A jelenlegi hazai és nemzetközi ajánlások a

COPD fenntartó kezelésében a III és a IV-es súlyossági fokozatban, elsősorban ismétlődő exacerbációk esetén javasolják az inhalációs szteroidok alkalmazását [65].

Összefoglalás

A COPD kezelése során a légúti gyulladás csökkentésében az inhalációs kortikoszteroidok és elhúzó hatású hörgőtágítók meghatározó jelentőségűek, de emellett a dohányzás abbahagyása az egyetlen olyan beavatkozás, amely képes fékezni a COPD-s betegek fokozódó légúti funkcióvesztését. E betegek szteroidérzékenysége azonban igen eltérő, és elsősorban a köpet eosinophiliát mutatók esetén várható szignifikáns légzésfunkció javulás a kezelés után. A szteroidérzékenység a köpet eosinophilsejtszámának meghatározásával vagy a kilélegezett levegő NO koncentrációjának ismeretében ítéltető meg. Mivel az utóbbi vizsgálat non-invasív módon, gyorsan és számottevően kisebb anyagi ráfordítással végezhető el, így a klinikai gyakorlatban szélesebb körű felhasználása várható.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény az OTKA 83338 sz. kutatási pályázat támogatásával készült, melyért az őszinte köszönetemet fejezem ki.

IRODALOM

- Lopez, A.D., Shibuya, K., Rao, C., Mathers, C.D., Hansell, A.L., Held, L.S., Schmid, V., Buist, S.: *Eur. Respir. J.* 27, 397-412 (2006).
- Mannino, D.M., Buist, A.S.: *Lancet*. 370, 765-773 (2007).
- Mathers, C.D., Loncar, D.: *PLoS. Med.* 3, e442 (2006).
- Nielsen, R., Johannessen, A., Benediktsdottir, B., Gislason, T., Buist, A.S., Gulsvik, A., Sullivan, S.D., Lee, T.A.: *Eur. Respir. J.* 34, 850-857 (2009).
- Strausz, J., Böszörményi-Nagy, G., Csekeő, A., Csoma, Z., Herjavec, I., Kovács, G., Nyári, L., Ostoros, G., Zsarnóczai, I.: *Korányi. Bulletin.* 2, 13-20 (2010).
- Scanlon, P.D., Connett, J.E., Waller, L.A., Altose, M.D., Bailey, W.C., Buist, A.S.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 161, 381-390 (2000).
- Calverley, P.M., Anderson, J.A., Celli, B., Ferguson, G.T., Jenkins, C., Jones, P.W., Yates, J.C., Vestbo, J.: *N. Engl. J. Med.* 356, 775-789 (2007).
- Decramer, M., Celli, B., Kesten, S., Lystig, T., Mehra, S., Tashkin, D.P.: *Lancet*. 374, 1171-1178 (2009).
- Barnes, P.J., Adcock, I.M.: *Lancet*. 373, 1905-1917 (2009).
- Pizzichini, E., Pizzichini, M.M., Gibson, P., Parameswaran, K., Gleich, G.J., Berman, L., Dolovich, J., Hargreave, F.E.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158, 1511-1517 (1998).
- Brightling, C.E., Monteiro, W., Ward, R., Parker, D., Morgan, M.D., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D.: *Lancet*. 356, 1480-1485 (2000).
- Antus, B.: *Orv. Hetil.* 151, 2083-2088 (2010).
- Cosio, M.G., Saetta, M., Agusti, A.: *N. Engl. J. Med.* 360, 2445-2454 (2009).
- van der Strate, B.W., Postma, D.S., Brandsma, C.A., Melgert, B.N., Luinge, M.A., Geerlings, M., Hylkema, M.N., van den Berg, A., Timens, W., Kerstjens, H.A.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 173, 751-758 (2006).
- Antus, B., Fillinger, J., Sebe, A., Jeney, C., Soltesz, I., Horvath, I.: *Exp. Mol. Pathol.* 81, 235-238 (2006).
- Antus, B., Yao, Y., Song, E., Liu, S., Lutz, J., Heemann, U.: *Transpl. Int.* 15, 494-501 (2002).
- Fischer, B.M., Pavlisko, E., Voynow, J.A.: *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 6, 413-421 (2011).
- Lázár, Z., Huszár, E., Kullmann, T., Barta, I., Antus, B., Bikov, A., Kollai, M., Horváth, I.: *Inflamm. Res.* 57, 367-373 (2008).
- Antus, B., Mucsi, I., Rosivall, L.: *Acta. Physiol. Hung.* 87, 5-24 (2000).
- Antus, B., Exton, M.S., Rosivall, L.: *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 14, 25-30 (2001).
- Antus, B., Yao, Y., Liu, S., Song, E., Lutz, J., Heemann, U.: *Kidney. Int.* 60, 1955-1963 (2001).
- Bafadhel, M., Saha, S., Siva, R., McCormick, M., Monteiro, W., Rugman, P., Dodson, P., Pavord, I.D., Newbold, P., Brightling, C.E.: *Respiration*. 78, 256-262 (2009).
- Antus, B., Barta, I., Czebe, K., Horvath, I., Csiszer, E.: *Inflamm. Res.* 59, 83-86 (2010).
- Siafakas, N.M., Antoniou, K.M., Tzortzaki, E.G.: *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2, 453-462 (2007).
- Barta, I., Kullmann, T., Csiszer, E., Antus, B.: *Int. J. Biol. Markers.* 25, 52-56 (2010).
- Kullmann, T., Barta, I., Csiszer, E., Antus, B., Horváth, I.: *Pathol. Oncol. Res.* 14, 481-483 (2008).
- Roche, N., Marthan, R., Berger, P., Chambellan, A., Chanez, P., Aguilaniu, B., Brillet, P.Y., Burgel, P.R., Chaouat, A., Devillier, P., Escamilla, R., Louis, R., Mal, H., Muir, J.F., Pérez, T., Similowski, T., Wallaert, B., Aubier, M.: *Eur. Respir. Rev.* 20, 175-182 (2011).
- Klebanoff, J. S.: *Ann. Intern. Med.* 93, 480-489 (1980).
- Smith, W. L., Urade, Y., Jacobson, P. L.: *Chem. Rew.* 111, 5821-5865 (2011).
- Church, D.F., Pryor, W.A.: *Environ. Health. Perspect.* 64, 111-126 (1985).
- Vaughan, J., Ngamtrakulpanit, L., Pajewski, T.N., Turner, R., Nguyen, T.A., Smith, A., Urban, P., Hom, S., Gaston, B., Hunt, J.: *Eur. Respir. J.* 22, 889-894 (2003).
- Ricciardolo, F.L., Rado, V., Fabbri, L.M., Sterk, P.J., Di Maria, G.U., Geppetti, P.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 159, 557-562 (1999).
- Clary-Meinesz, C., Mouroux, J., Cosson, J., Huitorel, P., Blaive, B.: *Eur. Respir. J.* 11, 330-333 (1998).
- Czebe, K., Kullmann, T., Csiszer, E., Barat, E., Horvath, I., Antus, B.: *Respiration*. 75, 322-327 (2008).
- Kullmann, T., Barta, I., Antus, B., Horváth, I.: *Lung.* 186, 263-268 (2008).
- Koczulla, R., Dragonieri, S., Schot, R., Bals, R., Gauw, S.A., Vogelmeier, C., Rabe, K.F., Sterk, P.J., Hiemstra, P.S.: *Respir. Res.* 10, 78 (2009).
- Kostikas, K., Papatheodorou, G., Ganas, K., Psathakis, K., Panagou, P., Loukides, S.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 165, 1364-1370 (2002).
- Antus, B., Barta, I., Kullmann, T., Lazar, Z., Valyon, M., Horvath, I., Csiszer, E.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 182, 1492-1497 (2010).
- Kullmann, T., Barta, I., Lazar, Z., Szili, B., Barat, E., Valyon, M., Kollai, M., Horvath, I.: *Eur. Respir. J.* 29, 496-501 (2007).

40. Czebe, K., Barta, I., Antus, B., Valyon, M., Horváth, I., Kullmann, T.: *Respir. Med.* 102, 720-725 (2008).
41. Kullmann, T., Barta, I., Antus, B., Valyon, M., Horváth, I.: *Eur. Respir. J.* 31, 474-475 (2008).
42. Gajdócsi, R., Bikov, A., Antus, B., Horváth, I., Barnes, P.J., Kharitonov, S.A.: *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 24, 271-275 (2011).
43. Antus, B., Barta, I.: *Lung. Cancer.* 75, 178-180 (2012).
44. Soter, S., Kelemen, K., Barta, I., Valyon, M., Csiszer, E., Antus, B.: *Transplantation.* 91, 793-797 (2011).
45. Antus, B., Fillinger, J., Csiszer, E., Czebe, K., Horváth, I.: *Orv. Hetil.* 146, 953-958 (2005).
46. Barnes, P.J.: *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 264-268 (2004).
47. Adcock, I.M., Ito, K., Barnes, P.J.: *COPD.* 2, 445-455 (2005).
48. Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P.J., Adcock, I.M.: *J. Exp. Med.* 203, 7-13 (2006).
49. Leigh, R., Pizzichini, M.M., Morris, M.M., Maltais, F., Hargreave, F.E., Pizzichini, E.: *Eur. Respir. J.* 27, 964-971 (2006).
50. Antus, B., Horváth, I.: *Orv. Hetil.* 148, 1251-1257 (2007).
51. Antus, B., Horváth, I., Barta, I.: *Respir. Med.* 104, 1377-1380 (2010).
52. Menzies, D., Nair, A., Lipworth, B.J.: *Chest.* 131, 410-414 (2007).
53. Antus, B., Horváth, I.: *J. Breath. Res.* 1, 024002 (2007).
54. Antus, B., Barta, I., Csiszer, E.: *Am. J. Transplant.* 11, 2774-2775 (2011).
55. Antus, B., Csiszer, E., Czebe, K., Horváth, I.: *Clin. Transplant.* 19, 377-382 (2005).
56. Papi, A., Romagnoli, M., Baraldo, S., Braccioni, F., Guzzinati, I., Saetta, M., Ciaccia, A., Fabbri, L.M.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162, 1773-1777 (2000).
57. Antus, B., Barta, I., Horváth, I., Csiszer, E.: *Respirology.* 15, 472-477 (2010).
58. Zietkowski, Z., Kucharewicz, I., Bodzenta-Lukaszyk, A.: *Respir Med.* 99, 816-824 (2005).
59. Ferreira, I.M., Hazari, M.S., Gutierrez, C., Zamel, N., Chapman, K.R.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 164, 1012-1015 (2001).
60. Kunisaki, K.M., Rice, K.L., Janoff, E.N., Rector, T.S., Niewoehner, D.E.: *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2, 55-64 (2008).
61. Dummer, J.F., Epton, M.J., Cowan, J.O., Cook, J.M., Condiffe, R., Landhuis, C.E., Smith, A.D., Taylor, D.R.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 180, 846-852 (2009).
62. Niewoehner, D.E.: *COPD.* 6, 1-3 (2009).
63. Tashkin, D.P., Celli, B., Senn, S., Burkhart, D., Kesten, S., Menjoge, S., Decramer, M.: *N. Engl. J. Med.* 359, 1543-1554 (2008).
64. Celli, B.R., Thomas, N.E., Anderson, J.A., Ferguson, G.T., Jenkins, C.R., Jones, P.W., Vestbo, J., Knobil, K., Yates, J.C., Calverley, P.M.: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 178, 332-338 (2008).
65. www.goldcopd.com [2012.01.22]

Érkezett: 2012. március 17.

Kockázat-megosztási technikák alkalmazása a közepes jövedelmű országokban

INOTAI ANDRÁS¹, KALÓ ZOLTÁN^{1,2*}

¹Syreon Kutató Intézet, Budapest, Thököly út 119. – 1146

²Eötvös Loránd Tudományegyetem, Társadalomtudományi Kar, Egészség-gazdaságtani Kutatóközpont, Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A. – 1117

*Levelezési cím: kalo@tat.k.elte.hu

Summary

Összefoglalás

Inotai, A., Kaló, Z.: Risk sharing methods in middle income countries

The pricing strategy of innovative medicines is based on the therapeutic value in the largest pharmaceutical markets. The cost-effectiveness of new medicines with value based ex-factory price is justifiable. Due to the international price referencing and parallel trade the ex-factory price corridor of new medicines has been narrowed in recent years. Middle income countries have less negotiation power to change the narrow drug pricing corridor, although their fair intention is to buy pharmaceuticals at lower price from their scarce public resources compared to higher income countries. Therefore the reimbursement of new medicines at prices of Western-European countries may not be justifiable in Central-Eastern European countries. Confidential pricing agreements (i.e. confidential price discounts, claw-back or rebate) in lower income countries of the European Union can alleviate this problem, as prices of new medicines can be adjusted to local purchasing power without influencing the published ex-factory price and so the accessibility of patients to these drugs in other countries. In order to control the drug budget payers tend to apply financial risk sharing agreements for new medicines in more and more countries to shift the consequences of potential overspending to pharmaceutical manufacturers. The major paradox of financial risk-sharing schemes is that increased mortality, poor persistence of patients, reduced access to healthcare providers, and no treatment reduce pharmaceutical spending. Consequently, payers have started to apply outcome based risk sharing agreements for new medicines recently to improve the quality of health care provision. Our paper aims to review and assess the published financial and outcome based risk sharing methods. Introduction of outcome based risk-sharing schemes can be a major advancement in the drug reimbursement strategy of payers in middle income countries. These schemes can help to reduce the medical uncertainty in coverage decisions for valuable innovative healthcare technologies. However risk-sharing schemes can also reduce the transparency of pharmaceutical pricing and reimbursement, as the payback, and consequently the actual price per patient can be calculated only retrospectively. Therefore risk-sharing agreements can be interpreted as special forms of confidential pricing agreements to facilitate the implementation of differential pricing in middle income countries.

Keywords: outcome based risk sharing, financial based risk sharing, middle income countries, international price referencing, narrow price corridor

Az innovatív gyógyszerek stratégiai árképzése a legnagyobb gyógyszerpiacgal rendelkező országokban a terápia értékén alapul. Az új gyógyszerek értékalapú termelői ára költség-hatékonysági számítással igazolható. A nemzetközi árreferencia rendszer és a párhuzamos kereskedelem miatt az új gyógyszerek ára egyre inkább szűk globális ársávban mozog. A közepes jövedelmű államok finanszírozói korlátozott mozgástérrel rendelkeznek a szűk nemzetközi termelői árfolyosó befolyásolására, miközben a magas jövedelmű országokhoz képest szűkebb erőforrásaik miatt joggal szeretnék a gyógyszereket alacsonyabb áron megvásárolni. Kelet-Közép-Európa sok országában az innovatív gyógyszerek közfinanszírozása a nyugat-európai árakon gyakran nem indokolható társadalmi szempontból. A termelői árak csökkentése bizalmas megállapodás keretében (rabatt adása, utólagos visszafizetés, nem publikus ármegállapodás) megoldást jelenthet a problémára az Európai Unió alacsonyabb jövedelmű országaiban, mert anélkül igazítja a gyógyszerek árát a helyi vásárlóerőhöz, hogy egyúttal befolyásolná az árakat más országokban, és ezen keresztül a betegek hozzáférését az érintett terápiákhoz. A finanszírozók a kasszák betarthatósága miatt egyre több országban pénzügyi kockázat-megosztási megállapodásokkal hátrítják át a gyártókra az új gyógyszerek miatti kiadásnövekedés következményeit. Az ilyen technikák fő ellentmondása, hogy a megnövekedett halálozás, a rossz beteg-együttműködés, az egészségügyi ellátórendszer hozzáférhetőségének csökkenése, a kezelés elmulasztása csökkenti a gyógyszerkiadásokat. Részben ezért a finanszírozók az ellátás minőségét javító eredményalapú kockázat-megosztási technikák irányába mozdultak el az utóbbi időben. Jelen tanulmány célja a nemzetközi szakirodalomban publikált pénzügyi és eredményalapú kockázat-megosztási technikák áttekintése és értékelése. Az eredményalapú kockázat-megosztási technikák alkalmazása paradigmaváltást jelent a közepes jövedelmű országok gyógyszer-finanszírozási gyakorlatában. A kezelés eredményességének kockázatát kezelő technikák mérséklék a nagy értékű innovatív gyógyszerek befogadása körüli orvos-szakmai bizonytalanságot. A kockázat-megosztási módszerek alkalmazása mindazonáltal csökkenti a gyógyszer-árképzés és támogatás transzparenciáját, hiszen az utólagos visszafizetés hatása az egy betegre kifizetett gyógyszerárra csak később lesz látható. A kockázat-megosztási technikák tehát a bizalmas jellegű ármegállapodások egy fajtájának tekinthetők, melyek elősegítik az alacsonyabb gyógyszerárak elérését a közepes jövedelmű országokban.

Kulcsszavak: eredményalapú kockázat-megosztás, pénzügyi kockázatmegosztás, közepes jövedelmű országok, nemzetközi árreferencia rendszer, szűk ársáv

Háttér

Az innovatív gyógyszerek stratégiai árképzése a legnagyobb gyógyszerpiaccal rendelkező országokban a terápia értékén alapul. Az új gyógyszerek értékalapú termelői ára költség-hatékonysági számítással igazolható. A nemzetközi árreferencia rendszer és a párhuzamos kereskedelem miatt az új gyógyszerek ára egyre inkább szűk globális ársávban mozog [1].

A közepes jövedelmű államok finanszírozói korlátozott mozgástérrel rendelkeznek a szűk nemzetközi termelői árfolyosó befolyásolására, miközben a magas jövedelmű országokhoz képest szűkösebb erőforrásaik miatt joggal szeretnék a gyógyszereket alacsonyabb áron megvásárolni. Egy minőségi életéért az alacsonyabb jövedelmű országok nem fizethetnek annyit, mint a magas jövedelműek. Ráadásul a közepes jövedelmű országokban az alacsonyabb bérköltségek miatt az egészségügyi szolgáltatások relatív ára alacsonyabb, mint a nyugat-európai országokban, és emiatt az eredményesebb gyógyszerterápia által elkerülhető egészségügyi kezelések relatív értéke is kisebb. Közép-Kelet-Európa sok országában az innovatív gyógyszerek költség-hatékonysága a nyugat-európai árakon gyakran nem bizonyítható, ezért közfinanszírozásuk társadalmi szempontból nem indokolható.

A termelői árak csökkentése bizalmas megállapodás keretében (rabatt adása, utólagos visszafizetés, nem publikus ármegállapodás) megoldást jelenthet a problémára az Európai Unió alacsonyabb jövedelmű országaiban, mert anélkül igazítja a gyógyszerek árát a helyi vásárlóerőhöz, hogy egyúttal befolyásolná az árakat más országokban, és ezen keresztül a betegek hozzáférését az érintett terápiákhoz [2]. A finanszírozók a kassza betarthatósága miatt egyre több országban pénzügyi kockázat-megosztási megállapodásokkal hárítják át a gyártókra az új gyógyszerek miatti kiadásnövekedés következményeit. Az ilyen technikák fő ellentmondása, hogy a megnövekedett halálozás, a rossz beteg-együttműködés, az egészségügyi ellátórendszer hozzáférhetőségének csökkenése, a kezelés elmulasztása csökkenti a gyógyszerkiadásokat. Részből ezért a finanszírozók az ellátás minőségét javító eredményalapú kockázat-megosztási technikák irányába mozdultak el az utóbbi időben.

Célok és módszerek

Jelen dolgozat célja a publikált pénzügyi és eredményalapú kockázat megosztási technikák bemutatása a hazai és nemzetközi szakirodalom részletes áttekintése alapján. A cikk ismerteti az egyes technikák előnyeit és hátrányait, és konkrét példákat mutat be az egyes módszerekre.

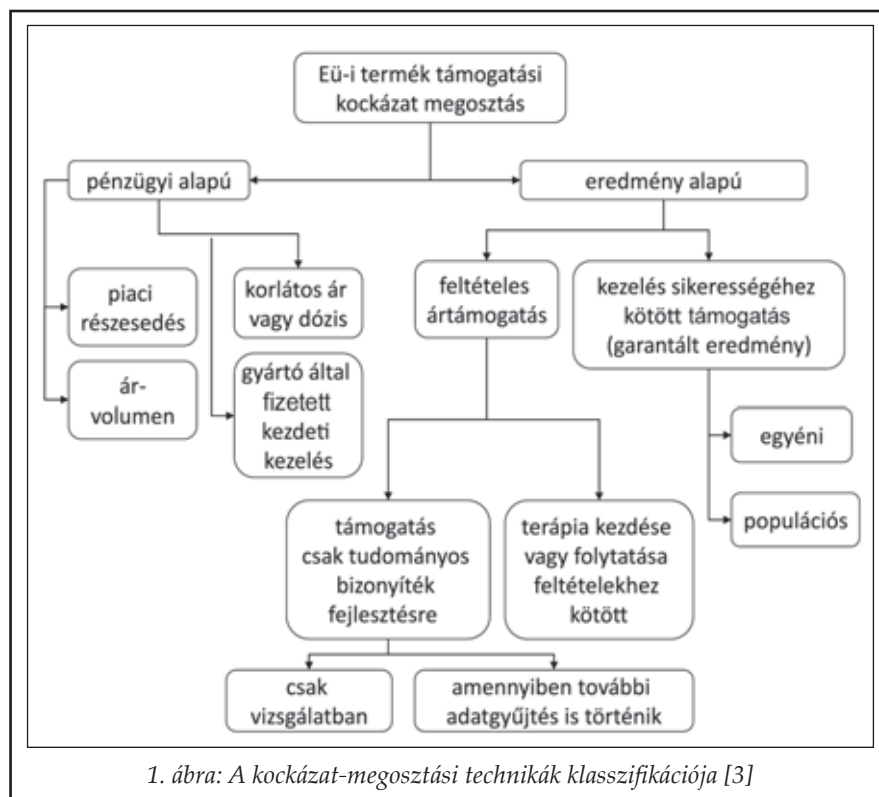
kat mutat be az egyes módszerekre.

A kockázat-megosztási technikák klasszifikációja

Az egészségügyi termékek támogatási kockázatának megosztására szolgáló technikák csoportosítását az 1. ábra szemlélteti [3]. A tanulmány a továbbiakban ezen technikákat mutatja be, példákkal alátámasztva.

1. Pénzügyi alapú kockázat-megosztás fajtái

A kiadások tervezhetőségének biztosítása a finanszírozhatósági kockázat megosztása vagy áthárítása útján lehetséges. A kassza betartására széleskörűen alkalmaznak pénz-



1. ábra: A kockázat-megosztási technikák klasszifikációja [3]

ügyi kockázat-megosztási technikákat. Ezek segítségével biztosítható, hogy a kiadások ne haladják meg az előre meghatározott szintet, a mikro-, mezo-, vagy makroszintű korlát feletti kiadásokat pedig áthárítják a szolgáltatókra vagy beszállítókra.

1.1 Ár-volumen korlát

1.1.1 Gyártói korlátozás

Az ár-volumen korlát alkalmazása esetén a finanszírozó meghatározott betegszám gyógyszer-szükségletének erejéig vállalja a kezelés finanszírozását. Amennyiben a kifizetett gyógyszer-támogatás értéke meghalad egy előre meghatározott mértéket, a túllépést a gyártók visszatérítik a finanszírozónak. A technika nemcsak abszolút betegszámhoz, hanem piaci részesedéshez is köthető. Az ár-volumen megállapodás alkalmas az új termékek piaci penetrációjának lassítására. Az ár-volumen megállapodás vonatkozhat együttesen több gyógyszerre is; amennyiben közel azonos a hatásuk, a finanszírozó az egymással versengő gyógyszerekre közös volumenlimitet határozhat meg. Az atorvastatin esetén egy bizonyos eladási érték felett a gyártónak kellett fizetnie Új-Zélandon [4], és hasonló egyezményt kötöttek rheumatoid arthritisben etanercept hatóanyagra Ausztráliában [5]. Magyarországon az ár-volumen megállapodás kötelező eleme az új gyógyszerek befogadásának.

1.1.2 Intézményi korlátozás

Az intézményi szintű korlátozás az ár-volumen megállapodás speciális formája, ahol a kockázatot nem a gyártó, hanem a szolgáltató fizeti. Ilyen, mezo-szinten alkalmazható technika a teljesítményvolumen-korlát (TVK), amely a kizárólag kórházi ellátás során alkalmazott gyógyszeres terápiák (pl. egyes magas költségű onkológiai vagy immunológiai készítmények) pénzügyi kockázatát kezeli. Ezeket a teljesítményvolumen-korlátos fekvőbeteg-ellátási kasszába áthelyezve biztosítható a kiadások tervezhetősége. Negatív hatása ugyanakkor az ilyen technikának, hogy a túlságosan alacsonyan meghúzott TVK korlátozza a hozzáférhetőséget, vagy ellenkezőleg, rontja az intézmények gazdálkodásának egyensúlyi helyzetét. A technika további hátránya, hogy fűnyírólv-szerűen valamennyi ellátásra hatással van a volumenkorlát elérését követően.

1.2 Piaci részesedés alapú korlátozás

1.2.1 Terápiás területre vonatkozó piaci részesedés alapján

A piaci részesedés korlátozása azt jelenti, hogy a gyártó terméke adott terápiás területen meghatározott piaci részesedés felett nem kap támogatást/csökkentett támogatást kap/a gyártónak visszatérítést kell fizetnie. A piaci részesedés alapú megállapodások vonatkozhatnak egyszerre több vállalat azonos jellegű termékeire. A módszer akkor alkalmazható elsősorban, amikor a drágább termék csak az olcsóbb termék hatástalansága vagy intolleranciája esetén alkalmazható, és ennek mértéke becsülhető nagyságrendű.

1.2.2 Makroszintű gyártói költségvetési korlát

A gyógyszerkasszára megszabott kemény költségvetési korlát olyan makroszintű korlátozás, melyben a kassza túllépése esetén döntően a piaci részesedésen alapuló algoritmus alapján ír elő a gyógyszerforgalmazóknak visszafizetési kötelezettséget.

1.2.3 Makroszintű intézményi költségvetési korlát

Az intézményi szintű korlátozás makroszintű módja például a fekvőbeteg ellátás homogén betegcsoport (HBCs) értékeinek lebegtetése, amikor a finanszírozó a túllépés kockázatát szintén nem a gyártókra, hanem a szolgáltatókra helyezi át. Mivel a ki nem fizetett díjtétel vesztesége nagyobb mértékben érinti a nagyobb volument kibocsájtó intézményeket, ez a finanszírozási technika felfogható piaci részesedésen alapuló pénzügyi jellegű kockázat-megosztásnak.

1.3 Korlátos dózis

Amennyiben bizonyos gyógyszeres terápiák, például egyes magas költségű rákellenes kezelések során az alkalmazott dózis, vagy kúrahossz (vagyis a ciklusszám és ezen keresztül a kumulatív dózis) előzetes becslése nehézséget jelent, a finanszírozó csak meghatározott ciklusszámgig vagy aggregált dóziséig támogatja az adott készítményt. Az e feletti gyógyszer-mennyiséget a gyártó ingyen biztosítja a betegek részére.

A macula-degenerációban adható ranibizumabot például egy személyre összesen 14 injekcióig finanszírozza az Egyesült Királyság Nemzeti

Egészségügyi Rendszere [6] (NHS). A lenalidomide myeloma multiplexben kiadható két éves dózismennyisége szintén korlátos (26 ciklus) [6].

1.4 Árcsökkentés

A készítmény árát a támogatás feltételeként csökkentik oly módon, hogy az új árral számolt inkrementális költséghatékonysági ráta ne haladjon meg egy bizonyos küszöbértéket. Az effektív ár csökkenthető áru-rabattal, egyedi visszafizetési kötelezettséggel vagy direkt árcsökkentéssel. Amennyiben az árcsökkentés bizalmas megállapodáson alapul, a publikus termelői ár nem csökken. A nemzetközi árreferencia miatt a gyártók számára nem előnyös, ha a tényleges árcsökkentés a gyártó nyilvános áraiban is láthatóvá válik [2]. Ez ugyanis jelentősen korlátozza az operatív ármenedzsment mozgásterét. Az erlotinib-et kissejtes tüdőrákban csak a docetaxellel azonos összköltség mellett javasolta finanszírozói befogadásra az angliai National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) [6].

1.5 Gyártó által fizetett kezdeti költség

Nemzetközi példák találhatók arra, hogy a gyógyszergyártó a kezelés kezdeti költségét vagy a gyógyszeres kezeléshez előzetesen szükséges diagnosztikai teszt költségét is átvállalja a támogatás megszerzésének feltételeként, ami a reszponder betegek szűrésében bír jelentőséggel. A fentiek alapján ennek a technikának is több módosulata ismert:

- *Ingyenes kezelés a terápia kezdeti időszakában.* A gyártó a kezelés első pár hónapjában meghatározott ideig ingyenesen biztosítja a gyógyszert a rásszorulók részére.
- *Objektív reszponder válaszig ingyenes gyógyszer.* A gyártó a reszponder betegek szűréséig a gyógyszert ingyen adja. Ily módon a finanszírozó csak azoknak biztosítja a terápiát, akik objektív reszponderek, azaz akiknél biztosan hasznosul a kezelés.
- *Objektív válaszadás méréséhez ingyenes diagnosztika.* A gyártó a reszponder betegek szűréséhez szükséges diagnosztikát ingyen adja. A szóban forgó diagnosztika lehet egy laborteszt, képalkotó diagnosztika stb.

A pénzügyi alapú kockázat-megosztás korlátai

A finanszírozó célja, hogy a rendelkezésére álló

költségkeretből a lehető legtöbb egészségnyerést vásárolja. A pénzügyi kockázat megosztása elősegíti az egészségbiztosítási büdzsé makroszintű egyensúlyát (a kassza tartását). A szolgáltatások minőségére (az egészségnyerés maximalizálására) azonban negatív hatással van: a halálozás növekedése, a csökkenő terápiahűség, a szűkebb hozzáférhetőség, a kezelés elmulasztása vagy elhalasztása is csökkenti a kiadásokat, azaz a pénzügyi kockázatokat. A gyengébb minőségű szolgáltatás vásárlása tehát elősegíti a fiskális kontrollt. A fenti paradoxon felismerése eredményezte a minőség garantálását előtérbe helyező eredményesség alapú kockázat-megosztási technikák fokozott elterjedését.

2. Eredményesség alapú kockázat-megosztási technikák

Az innovatív készítmények valós életben jelentkező eredményessége a finanszírozói befogadás pillanatában csak korlátozottan becsülhető meg. Az egészségnyerés bizonytalansága kiszámítható költségek mellett a gyógyszer költséghatékonyságának meghatározása során is bizonytalan faktor. Az ebből eredő kockázat kezelése eredményesség alapú kockázat-megosztással történhet.

2.1 Feltételes ártámogatás

A finanszírozó ebben az esetben csak előre meghatározott feltétel teljesülése (klinikai vizsgálatban való részvétel/klinikai válasz stb.) esetén finanszírozza a terápiát:

2.1.1 Támogatás csak tudományos bizonyíték fejlesztésére

Számos nemzetközi példa ismeretes arra, hogy az egészségbiztosító csak az általa szervezett és finanszírozott klinikai vizsgálatban részt vevő betegek számára biztosítja a terápiát. Ebben az esetben a feltételes befogadás egyben további tudományos bizonyítékok előállítását is szolgálja. Más esetben az egészségbiztosító további, jellemzően a mellékhatás-profilra vonatkozó adatok gyűjtését írja elő, például egy fázis IV. vagy obszervációs vizsgálatban. Hasonló vizsgálatok szolgálhatnak alapul egyéb farmakoökonomiai adatok (beteg-együttműködés, életminőség/hasznosság [7], költség és erőforrás igénybevétel) generálására is [8]. Az ilyen megoldások akkor tekinthetők racionálisnak, ha a vizsgálat szervezésének, monitorozásának és kiértékelésének költségei kisebbek, mint a biztosabb

eredményen alapuló helyes döntés által generált aggregált terápiás érték vagy megtakarítás [2].

– *Befogadás csak vizsgálatban.* Az Egyesült Királyságban a sclerosis multiplex kezelésére szolgáló készítményeket (béta-interferon és glatiramer acetate) csak prospektív kohorsz vizsgálat keretében kaphatták a betegek. A gyártókat visszafizetési kötelezettség terheli, amennyiben a hosszútávú eredményességi végpontok nem hozzák az előzetesen várt eredményeket, amely maximum 36 000 GBP/életminőséggel korrigált életév (QALY) költség-hatékonysági rátát jelent [9, 10]. Csak a vizsgálatban résztvevő betegek kapják támogatott módon a terápiát (pl. cochleáris implantáció, USA) [3]. Ily módon ez tulajdonképpen klinikai vizsgálat finanszírozásának fogható fel.

– *Befogadás csak vizsgálat esetén.* A terápiával kezelt betegeknek csak egy részét vonják be a vizsgálatba, de az összes beteg támogatott módon kapja a terápiát (pl. a risperidone Franciaországban) [3]. A csak vizsgálat esetére történő befogadásnak több lehetséges fajtája ismert:

- támogatott a terápia, de a betegekről további biztonságossági adatokat kell gyűjteni a gyártónak (pl. biohasonló termékek, vagy termékek előzetes biztonságossági figyelmeztetésével),
- támogatott a terápia, de a betegekről valós életbeli költség és hasznosság adatokat kell gyűjteni,
- támogatott a terápia, de regisztert kell felállítani (pl. rheumatoid arthritis, ahol nincsenek a biológiai terápiákkal kapcsolatban összehasonlítható adatok).

2.1.2 A terápia kezdése vagy folytatása feltételekhez kötött

– *Betegkör előzetes szűkítése.* A terápiát csak olyan alcsoporthoz tartozóknak támogatják, akiknél nagyobb a várható válaszadási ráta vagy az egészségnyereség mértéke. A szűkítés alapulhat a betegség súlyossági fokán (pl. csak súlyos betegeknek, vagy ellenkezőleg, még szövődményekkel nem rendelkező betegeknek), társbetegségen (pl. a diabeteses alcsoporthoz), előzetes terápián (pl. csak másodvonalbeli terápia az olcsó első vonalbeli kezelés sikertelensége esetén), genetikai státuszon (pl. molekuláris diagnosztikai teszttel szelektált betegcsoport), de akár a szolidaritási elv korláto-

zásán (pl. csak nem dohányzó betegek alcsoporthoz) is. A betegkör szűkítése csökkenti a költségvetési hatást, növeli a kezeléshez kapcsolódó egyéni egészségnyereséget, és a kockázatokat döntően a páciensekre hárítja át.

– *Betegkör szűkítése a kezelés megkezdése után.* A terápia kezdetétől számított meghatározott idő elteltével kiértékelik a klinikai választ. A további finanszírozás feltétele lehet egy diagnosztikai teszt elvégzése is. Egy onkológiai készítmény esetén, ha a terápia kezdetét követően két hónappal előírnak egy diagnosztikai vizsgálatot, a terápia csak az objektív kritérium szerinti reszponder betegek esetében folytatható, míg a nem megfelelő választ mutató betegek esetén a terápiát fel kell függeszteni. A megállapodás a non-reszponder betegek finanszírozásának fel függesztése mellett előírhatja, hogy a gyártó a non-reszponder betegek terápiáját térítse vissza. A válasz kiértékeléséig történő kezelést fizetheti akár a finanszírozó, akár a gyártó. Utóbbi esetben a finanszírozó csak a biztos reszponderek kezelését fizeti, sőt, sok esetben a gyártó állja a teszt költségét is. Ebben az esetben tehát nem kockázat-megosztásról, hanem kockázat-átvételről beszélünk. A gyártó a kezelés kiértékeléséig kedvezményt is adhat. Az ilyen megállapodások fontos feltétele, hogy létezzen egy olyan rövid távú marker (pl. tumor-válasz), amely mindkét fél számára elfogadható a reszponder betegek elkülönítésében [3]. A reszponder betegek kezelése javítja a költséghatékonysági rátát, illetve enyhíti a finanszírozó bizalmatlanságát az eredményesség bizonyítottságának hiánya miatt. Ugyancsak segít kezelni azokat az eseteket, amikor a beteg vagy orvos nem az eredményesség, hanem a megfelelő alternatívák hiánya miatt folytatja a készítmény adását. Olaszországban az Alzheimer-kór kezelésére szolgáló készítmények költségét a kezelés első három hónapjában a gyártó állja. Azoknál a betegeknél, ahol a terápia elérte célját, a kezelést további két évig finanszírozza a biztosító [11].

2.2 Kezelés sikerességéhez kötött (teljesítmény-függő) támogatás

Az effektív támogatás mértéke (nem feltétlen a direkt árváltoztatáson, hanem akár az eredménytelenség esetén jelentkező visszatérítés költségcsökkentő hatásán keresztül) az új terápia valós életben nyújtott teljesítményéhez kötött. A kezelés ered-

ményéhez kötött támogatást akkor alkalmazzák, amikor a gyártó biztos terméke eredményességében, és kész alacsonyabb támogatást is elfogadni, ha az mégsem hozza az elvárt paramétereket. A technika alkalmazása az erősen kompetitív piacokra jellemző. Az ilyen egyezmények jellemzően rabottot, vagy visszafizetés lehetőségét részesítik előnyben a transzparens árcsökkentés helyett, tükrözve a gyártók erőfeszítéseit a publikus listaár megőrzésére. Utóbbinak a nemzetközi árreferencia szempontjából van jelentősége [2, 3], hiszen jelentősen befolyásolják az operatív ármenedzsment mozgásterét. Ebben a tekintetben kockázat-átárhításról beszélünk, ha a finanszírozó költségei csak csökkenhetnek (az eredményesség a vártnál rosszabb), míg kockázat-megosztásról, ha a vártnál jobb eredményesség a finanszírozó költségeit akár növelheti is. Az innovatív gyógyszerkészítmények érték alapú árképzésének (*value based pricing*) ugyanis egyik alapelve, hogy többlet eredményességért, azaz hozzáadott értékért (pl. életminőség javulásért, beteg-együtműködés növekedésért, elkerült kórházi kezeléseikért) a standard terápiánál magasabb ár indokolható a társadalom szemszögéből [12]. Az eredményesség vizsgálható mind az egyén, mind egy adott betegpopuláció szintjén, ezért a tanulmány a teljesítmény függő támogatási technikákat a továbbiakban ebben a bontásban közli:

2.2.1 Egyéni szintű teljesítményhez kötött támogatás

A kezelés sikerességét ebben az esetben az egyes betegekhez köthető kimenetek alapján határozzák meg. Az egyéni teljesítmény lehet beteg-együtműködéshez kötött, elkerült major eseményekhez kötött, vagy intermedier kimenethez kötött, az alábbiak szerint:

- *Egyéni szintű beteg-együtműködésen alapuló támogatás.* A vizsgált kimenet ebben az esetben a beteg-együtműködés valamilyen formája (adherencia, compliance vagy perzisztencia). A terápia javaslatával nem együtműködő beteg után a finanszírozó visszakapja a támogatás egy részét vagy egészét.
- *Egyéni szintű major eseményen alapuló támogatás.* A vizsgált kimenetek ebben az esetben az elkerült major események. Major esemény előfordulásaikor a gyártó visszatéríti a gyógyszer árát és/vagy az esemény kezelési költségét. Egy olyan gyógyszer esetén, amely egy finanszírozási konzek-

venciával járó eseményt előz meg, a gyártó az esemény költségét átvállalja. Például új osteoporosis elleni készítmény esetén, ha a készítményt kapó beteg csípő, vagy csigolya-törést szenved, a gyártó visszafizeti a gyógyszer árát, vagy a csonttörés kezelési költségét. Hasonlóan, nemzetközi példa látható arra, hogy a koleszterinszint csökkentő gyártója a készítményre állított betegek által elszenvedett infarktusok után visszatérítést fizet. A kezelés eredményességében rejlő bizonytalansági kockázatot a finanszírozó ily módon a gyártóra helyezi át.

- *Egyéni szintű, intermedier kimeneten alapuló támogatás.* A célértéket (bármely köztes végpontot, mint pl. koleszterinszintet, vérnyomás értéket, vagy vércukor-paramétereket, tumorméret-csökkenést stb.) el nem érő beteg terápiájának költségét a gyártó visszafizeti.
- *Egyéni szintű garantált eredményen alapuló támogatás.* A gyártó árendedményt, visszafizetést vagy rabottot ad, ha terméke az egyes beteg szintjén nem hozta az előzetesen megállapított paramétereket, például nem csökken a fogyasztószer esetében a testsúly az elvárt mértékben. Onkológiai gyógyszer esetében a gyártó vállalhatja, hogy például az egy éven belüli tumorprogresszió esetén visszafizeti a gyógyszer-támogatást a finanszírozónak. A progressziómentes túléléshez hasonló vállalatot tehet a gyártó a beteg túlélésére is.

2.2.2 Populációs szintű teljesítményhez kötött támogatás

A fent leírt technológia természetesen nemcsak egyéni, hanem populációs szinten is értelmezhető. A finanszírozó ebben az esetben nem az egyes beteg kimeneteit vizsgálja, hanem azt nézi, hogy az új készítmény a klinikai vizsgálat eredményeit (elvárt compliance, major események becsült gyakorisága, intermedier kimenet stb.) hozza-e. A klinikai vizsgálati eredmények gyártó általi garantálása valós körülmények között, populációs szinten erősen korlátozott alkalmazhatósággal bír Magyarországon. A tapasztalatok alapján ugyanis a hazai orvosok egyrészt a mellékhatásoktól való félelem, másrészt a HBCS rendszer sajátosságai miatt az onkológiai gyógyszereket gyakran terápiásan szuboptimális dózisban alkalmazzák. Részen ebből adódóan a hazai túlélési adatok jellemzően rosszabbak a nemzetközi klinikai vizsgálati eredményeknél.

I. táblázat

Eredmény alapú kockázat-megosztási technikák előnyei és hátrányai az egyes résztvevők (betegek, egészségügyi szolgáltatók, finanszírozók/döntéshozók és a gyártók) szemszögéből [16]

	Betegek	Szolgáltatók	Finanszírozók /Döntéshozók	Gyártók
Előnyök	<ul style="list-style-type: none"> • korai hozzáférés az ígéretes innovatív technológiákhoz • hozzáférés olyan technológiákhoz, amelyek esetleg más módon nem kerülnének be a támogatott körbe • több kezelési alternatíva 	<ul style="list-style-type: none"> • korai hozzáférés az ígéretes innovatív technológiákhoz • hozzáférés olyan technológiákhoz, amelyek esetleg más módon nem kerülnének be a támogatott körbe • több kezelési alternatíva • összekapcsolja a klinikai kutatást a döntéshozattal • segít a technológiák minőségének biztosításában 	<ul style="list-style-type: none"> • segít a döntéshozatal kockázatának kezelésében • indokolja a támogatás odaítélését • biztosítja a „minőséget a pénzért” szemléletet • fenntartja a finanszírozhatóságot • igazságos és fenntartható hozzáférést biztosít a befogadás szabályozásával • elősegíti a döntéshozó szempontjából releváns végpontok, elrendezés stb. alkalmazását • összekapcsolja a klinikai kutatást a döntéshozattal • csökkenti a hiba lehetőségét az ígéretes, de még kevésbé alátámasztott technológiák esetén • hozzájárul az erőforrások optimálisabb allokációjához • segíti a gyártók és döntéshozók együttműködését 	<ul style="list-style-type: none"> • az egyezmények elismerik az innovációt • javítja a K+F kiadások megtérülését • biztosítja a gyártó szempontjainak is megfelelő listaárat • rugalmas, a tervezettnél jobb eredményesség esetén lehetővé teszi az áremelést • biztosítja a hozzáférést a bizonytalan eredményes-ségű technológiákhoz, amelyeket egyébként elutasítának • csökkenti a hiba lehetőségét az ígéretes, de még kevésbé alátámasztott technológiák esetén • összekapcsolja a klinikai kutatást a döntéshozattal • segíti a gyártók és döntéshozók együttműködését
Hátrányok	<ul style="list-style-type: none"> • azon betegek, akik nem felelnek meg a megállapodás beválogatási kritériumainak, nem jutnak az új terápiához • a betegeknek részt kell venniük a vizsgálatban a hozzáférés érdekében • az új technológia eredményessége/ biztonságossága nem kellően bizonyított 	<ul style="list-style-type: none"> • szükséges az orvosok elkötelezettsége a technológia értékelésében • az orvosok adminisztrációs terhei növekednek • a randomizáció etikai problémái alááshatják a bizonyítékokon alapuló orvoslást • a bizonytalan mellékhatású készítmények növelhetik az orvos-perek kockázatát 	<ul style="list-style-type: none"> • a technológia értékével kapcsolatos nézetkülönbségeket fel kell oldani • olyan technológiákba is történhet a befektetés, amik később nem bizonyulnak költség-hatékónak • adminisztratív költségek (monitorozás és újraértékelés az új bizonyítékok alapján) • az ideiglenesen engedélyezett technológiák visszavonásának nehézségei • nehéz lehet megegyezni arról, mi a számít elégséges bizonyítéknak • fokozza a betegek várakozásait • nehéz lehet megegyezni arról, ki fizesse a járulékos költségeket • a megállapodás nem a megfelelő kérdésekre keresi a választ • bátoríthat más gyártókat, hogy készítményeiket nem teljes dokumentációval adják be 	<ul style="list-style-type: none"> • az egyezmény túl bonyolult lehet, jelentős adminisztratív (pl. monitorozási) költségekkel • olyan megállapodás létrehozásának nehézsége, amely elégséges bizonyítékot tartalmaz a terápiás előny igazolására • adatgyűjtés és elemzés terhei • pénzügyileg kockázatos lehet • a gyártó árazási döntéseinek mozgásterét korlátozhatja • az eredményes készítmények piacra jutását is lassíthatja • nehéz lehet megállapodni az egyezmény vagy az adatgyűjtés finanszírozásáról

- *Becsült beteg-együttműködésen alapuló támogatás.* A finanszírozó a teljesítmény indikátoraként a klinikai vizsgálatban becsült compliance értékét alkalmazza. Az indikátor lehet a gyártó által vállalt perzisztencia mutató is – pl. krónikus terápia esetén a betegek minimum 50%-a még szedi a gyógyszeres meghatározott idő elteltével.
- *Major esemény becsült gyakoriságán alapuló támogatás.* Amennyiben az osteoporosis elleni készítmény valós életben mért töréscsökkentő hatása elmarad a klinikai vizsgálatban mérttől, a gyártó az így jelentkező finanszírozói többletkiadásokat visszafizeti.
- *Intermedier kimeneten alapuló támogatás.* A finanszírozó ebben az esetben az intermedier kimenet (vérnyomás, koleszterinszint stb.) klinikai vizsgálatban mért értékéhez hasonlítja a vizsgált betegpopuláció átlagát.
- *Klinikai gyakorlathoz kötött támogatás.* Szintén a populációs szintű teljesítményhez kapcsolt támogatás, ha a finanszírozó a támogatást a klinikai terápiás gyakorlathoz köti: Az Oncotype teszt finanszírozását a teszt klinikai döntéshozatalra gyakorolt hatásától, azaz a rutinszerűen alkalmazott túlkezelések mértékének csökkentésétől tette függővé [13].
- *Populációs szintű garantált eredmény alapú támogatás.* A gyártó árengedményt, visszafizetést vagy rabattot ad, ha terméke nem hozta az előzetesen megállapított paramétereket. A NHS-t a bortezomib gyártója például kompenzálta azon betegek után, akiknél a myeloma multiplexben 4 ciklus után nem következett be klinikai válasz [14]. A bortezomib 3,5 mg-os ampullájának listaára az Egyesült Királyságban 760 GBP volt. Az előzetes vizsgálatok mintegy 60%-os válaszarányt jeleztek előre. A gyártói rabatt miatt viszont az effektív listaár 300 GBP környékén volt, miközben a publikált ár változatlan maradt [15].

Az eredményalapú kockázat-megosztási technikák előnyeit és hátrányait az 1. táblázat foglalja össze, az egyes résztvevők (betegek, egészségügyi szolgáltatók, finanszírozók/döntéshozók és a gyártók) szemszögéből [16]. Annak eldöntését, hogy a jövőben a teljesítmény alapú, vagy a pénzügyi kockázat-megosztási mechanizmusok fognak-e elterjedni, számos tényező befolyásolja [2]:

1. A terápia bevezetését követő adatgyűjtés költség-

ge és megvalósíthatósága: A finanszírozói elektronikus adatbázisok alkalmazása jóval kisebb költséggel jár a tudományos bizonyítékok előállításában, jóllehet ez a vizsgálati elrendezés nem tudja valamennyi potenciális bizonytalansági tényezőt megfelelően kezelni. A finanszírozó gyakran preferálja, hogy további adatgyűjtés igénye nélkül a finanszírozási céllal gyűjtött adatokból is képes legyen a kockázatmegosztás alapjául szolgáló paraméter megfigyelésére. Ilyen paraméter a csípőtörés, a stroke, sőt a gyógyszereszedés perzisztenciája.

2. Bár bizonyos obszervációs vizsgálatokban a kérdéses paraméter mérése akkor is kis költséggel történhet, ha az információ rutinszerűen nem szerepel a finanszírozói adatbázisban (pl. elérte-e a beteg a vérnyomás, a HbA1c vagy az LDL koleszterin célértékét), de a finanszírozó ilyen esetekben alapvetően bizalmatlanul áll hozzá az orvosok által jelentett adatokhoz. Ilyenkor ugyanis lehetőség nyílik arra, hogy a gyártók az orvosok szakmai álláspontját pénzügyi eszközökkel befolyásolják a finanszírozó kontójára.
3. A vizsgálati adatok különböző országok közötti transzferabilitása egyre inkább előtérbe kerül. Ugyanakkor számos országban támogatási döntés elhalasztásának negatív példája igazolja a bevezetést követő adatgyűjtés racionalitását.
4. Az eredményalapú kockázat-megosztási technikák tranzakciós költsége jóval magasabb, mint például egy mikroszintű pénzügyi volumenkorlátról szóló egyezmény.
5. A gyártó és finanszírozó kockázatkerülésének mértéke: a köz- és magánszféra finanszírozói, a társadalmi vagy versengő egészségbiztosítók között ebben a tekintetben jelentős eltérések lehetnek. A versengő egészségbiztosítók nem feltétlenül érdekeltek olyan vizsgálatok folytatásában, amelyet versenytársaik is fel tudnak használni.
6. A szabályozási környezet: a szabályozók milyen követelményeket támasztanak a bevezetést megelőző vizsgálati adatokkal szemben, illetve, hogy a finanszírozók elfogadják-e például az esetleges későbbi áremelést (ha a készítmény eredményessége meghaladja a várakozásokat).

A kockázatmegosztás hazai gyakorlata

A hazai finanszírozási gyakorlat több éve alkalmazza a pénzügyi típusú kockázat-megosztási megállapodások széles skáláját (pl. makroszintű korlátozott kassza, teljesítmény-volumen korlát, ár-volumen megállapodás, kötelező gyártói visszafi-

zetés). Hazai példák az eredményességre vonatkozó kockázat-megosztási egyezmények nem nyilvános volta miatt még a nemzetközi szakirodalomban elérhető egyezményeknél is korlátozottabban állnak rendelkezésre. Ismertes, hogy 2012 januárjától egy új tüdődaganat kezelésére szolgáló terápia esetén a havi 560 ezer forintos betegenkénti árat az első három hónapban a gyártó állja, ezt követően a biztosító a reszponder betegek terápiáját finanszírozza. A válasz kiértékelése képalkotó diagnosztika segítségével történik [17].

A kockázat-megosztás hazai gyakorlatának lehetséges ellentmondásai

Az eredményesség vagy beteg-együttműködés alapú kockázat-megosztás legnagyobb előre jelezhető hazai problémája az, hogy az eredmények javítása növelheti az egészségügyi kiadásokat. Rövidtávú fiskális szempontok előtérbe kerülése esetén a finanszírozó a várttól elmaradó mértékű egészségnyereségben lenne érdekelt. A hazai finanszírozási gyakorlatban az elkülönített kasszák elősegítik a fenti helyzet kialakulását. Ebben az esetben ugyanis hiába ér el egy új gyógyszerkészítmény megtakarítást a gyógyító-megelőző kasszában, ha a felülről korlátozott gyógyszerkasszában – ennél akár kisebb volumenű – többlet-kiadás jelentkezik (vagyis az összesített költségvetési hatás megtakarítással járna). Ha az egyes kasszák ráadásul tartósan a pénzügyi kockázat-megosztási szint felett működnek, a finanszírozó nem tud megtakarítást realizálni, még akkor sem, ha a gyógyszerkiadások kismértékű növekedését a fekvőbeteg kassza kiadásainak jelentős csökkenése kíséri, például a major ellátási események számának (stroke, infarktus) esése miatt.

A pénzügyi és eredményalapú kockázat-megosztási technikák párhuzamos alkalmazása paradox gyakorlatot eredményez. Ha egy készítmény a vártnál jobb terápiahűséget vagy betegtúlélést eredményez (mikroszintű eredményalapú kockázat-megosztási technika), ezáltal a gyógyszerkasszában többlet kiadást generál, ennek többletköltségét nem korrekt a gyártóval kifizettetni egy árvolumen megállapodás kapcsán. Ebben az esetben a pénzügyi kockázatot esetleg úgy kezelheti a finanszírozó, hogy a kassza túllépését szétteríti a gyártók között, azaz a pénzügyi kockázat nem az adott készítményhez köthető [18].

További dilemmát okoz, ha a beteg a terápiát az adott készítményre vonatkozó támogatásvolumen szerződésben megállapított éves mennyiség felett

kapja. Ha a készítményre a mikroszintű pénzügyi kockázat-megosztási technika (támogatásvolumen szerződés) mellett eredményalapú kockázat-megosztást is alkalmaznak (terápiás kudarc esetén visszafizetési kötelezettség), vajon kudarc esetén jár-e a visszafizetési kötelezettség? Ebben az esetben beteg-szinten lebontva nem ismert, hogy ki-nek a terápiáját fizette a biztosító (a készítményre vonatkozó támogatásvolumen határa alatti betegszám) és kiét a gyártó (támogatásvolumen feletti betegszám). Ha pedig ez nem ismert, mi alapján kötelezhető a gyártó a non-reszponder betegek terápiájának visszafizetésére, ha esetleg az adott beteg a támogatásvolumen határa felett volt, ezért terápiáját eleve a gyártó fizette?

Hasonló helyzet áll elő akkor is, ha a mikroszintű eredményalapú kockázatkezelés (gyártói fizetési kötelezettség a szerződésben meghatározott nemkívánatos esemény miatt) makroszintű pénzügyi kockázat-megosztással (fekvőbeteg ellátás támogatásvolumen korlátja az adott intézményben) párosul. Ebben az esetben a finanszírozó olyan ellátás költségét fizetné meg a gyártóval, amelyről nem bizonyítható, hogy a finanszírozó számára költségként jelentkezett.

Összefoglalás

Az eredményalapú kockázat-megosztási technikák alkalmazása paradigmaváltást jelent a közepes jövedelmű országok gyógyszer-finanszírozási gyakorlatában. A kezelés eredményességének kockázatát kezelő technikák mérséklék a nagy értékű innovatív gyógyszerek befogadása körüli orvos-szakmai bizonytalanságot. A kockázat-megosztási módszerek alkalmazása mindazonáltal csökkenti a gyógyszer-árképzés és támogatás transzparenciáját, hiszen az utólagos visszafizetés hatása az egy betegre kifizetett gyógyszerára csak később lesz látható. A kockázat-megosztási technikák tehát a bizalmas jellegű ármegállapodások egy fajtájának tekinthetők, melyek elősegítik az alacsonyabb gyógyszerárak elérését a közepes jövedelmű országokban.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik a Sanofi kutatáshoz nyújtott támogatását.

IRODALOM

1. Inotai, A., Merész, G., Kaló, Z.: Acta Pharm. Hung. 80, 162-172 (2010).

2. Towse, A., Garrison, L.P.Jr.: *Pharmacoeconomics*. 28, 93-102 (2010).
3. Carlson, J.J., Sullivan, S.D., Garrison, L.P., Neumann, P.J., Veenstra, D.L.: *Health Policy*. 96, 179-190 (2010).
4. Begg, E., Sidweel, A., Gradiner, S., Nicholls, G., Scott, R.: *New Zealand Medical Journal*. 116, 360 (2003).
5. Lu, C.Y., Williams, K., Day, R., March, L., Sansom, L., Bertouch, J.: *BMJ*. 329, 415-416 (2004).
6. Briggs, A., Ritchie, K., Fenwick, E., Chalkidou, K., Littlejohns, P.: *Pharmacoeconomics*. 28, 163-170 (2010).
7. Anell, A., Persson, U.: *Eur. J. Health. Econ.* 6, 274-279 (2005).
8. McCabe, C.J., Stafinski, T., Edlin, R., Menon, D.; Banff AED Summit.: *Pharmacoeconomics*. 28, 143-152 (2010).
9. Department of Health, Government of United Kingdom.: *Cost Effective Provision of Disease Modifying Therapies for People with Multiple Sclerosis*. Health Service Circular, no. HSC 2002/004 (2002).
10. Chilcott, J., McCabe, C., Tappenden, P., O'Hagan, A., Cooper, N.J., Abrams, K., Claxton, K., Miller, D.H.: *Cost Effectiveness of Multiple Sclerosis Therapies Study Group*. *BMJ*. 326, 522 (2003).
11. Sparrowhawk, K.: *SCRIP—World Pharmaceutical News*. 6 (2007).
12. Kaló, Z.: *Innovatív egészségügyi technológiák fejlesztési és befogadáspolitikai kérdései*. In: Bodrogi, J. *A magyar egészségügy, Társadalmi-gazdasági megfontolások és ágazati véleményterkép*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010. pp. 304-337.
13. Carlson, J.J., Garrison, L.P.Jr., Sullivan, S.D.: *J. Manag. Care Pharm.* 15, 683-687 (2009).
14. National Institute for Health and Clinical Excellence.: *NICE technology appraisal guidance 129: bortezomib monotherapy for relapsed multiple myeloma*. (2007).
15. Center for Medicare and Medicaid Services.: *Coverage with evidence development*. Center for Medicare and Medicaid Services. (2008).
16. Stafinski, T., McCabe, C.J., Menon, D.: *Pharmacoeconomics*. 28, 113-142 (2010).
17. Danó, A.: *Med Tribune* 3. o. 2011. december 5.
18. Kaló, Z., Vokó, Z.: *LAM*. 20, 237-241 (2010).

Érkezett: 2012. március 18.
